



EFECTO DEL pH, TEMPERATURA Y FUENTE DE PROTEÍNA Y CARBOHIDRATOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS POR *Yarrowia lipolytica* EN CULTIVO SÓLIDO

EFFECT OF pH, TEMPERATURE AND PROTEIN AND CARBOHYDRATES SOURCE IN PROTEASE PRODUCTION BY *Yarrowia lipolytica* IN SOLID CULTURE

A.R. López-Flores¹, C. Luna-Urban¹, J.J. Buenrostro-Figueroa¹, R. Hernández-Martínez², S. Huerta-Ochoa¹, H. Escalona-Buendía¹, C.N. Aguilar-González³, L.A. Prado-Barragán^{1*}

¹Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco No. 186, México D.F. 09340, México.

²CONACYT Research Fellow. Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca. Av. Veracruz S/N Esq. Héroes de Puebla, Colonia Pemex. C.P. 95180, Tierra Blanca, Veracruz.

³Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Química. Blvd. Venustiano Carranza s/n Col. República Oriente, Saltillo, Coahuila, 25280, México.

Recibido 10 de Febrero de 2015; Aceptado 25 de Febrero de 2016

Resumen

En los últimos años ha aumentado el interés en el empleo de hongos y levaduras para la producción de proteasas en cultivo sólido. *Yarrowia lipolytica* es una levadura no patógena que ha sido reportada como excelente productora de proteasas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del pH, la temperatura y la fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en cultivo sólido. Se evaluó el uso de harina de pescado (HP) y harina de soya (HS) como fuente de proteína y carbohidratos a tres niveles de pH (5,7 y 9) y tres temperaturas (40, 45 y 50 °C). Las condiciones óptimas y fuente sustrato para obtener la máxima producción enzimática se definieron estadísticamente. El valor de pH ejerce el mayor efecto en la producción de proteasas, la máxima actividad enzimática (105 UI/mL) se obtuvo utilizando HS a pH de 7 y 45 °C a las 24-h de cultivo. Se alcanzó una reducción del 73 % en el tiempo de proceso con respecto a lo reportado previamente. La harina de soya es un sustrato económico para la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en cultivo sólido.

Palabras clave: pH, temperatura, harina de pescado (HP), harina de soya (HS), cultivo sólido, *Yarrowia lipolytica*, proteasas.

Abstract

In recent years the interest in the use of fungi and yeast for protease production in solid culture has increased. *Yarrowia lipolytica* is non-pathogenic yeast reported as excellent strain for protease production. The aim of this work was to determine the effect of pH, temperature and source of protein and carbohydrates on protease production by *Y. lipolytica* in solid culture. Fish flour (FF) and soybean meal (SM) were tested as protein and carbohydrates source at three levels of pH (5, 7 and 9) and temperature (40, 45 and 50 °C) for protease production by *Y. lipolytica*. Optimal conditions and substrate source for maximal enzymatic production were defined by statistical analysis. The pH value exhibited the greatest effect on protease production, maximal protease activity (105 UI/mL) was reached when using SM as protein and carbon source at pH 7, 45 °C after 24 h-culture. Process time was reduced around 83 % from similar research reports. Soybean meal is an excellent low cost substrate for proteases production by *Y. lipolytica*.

Keywords: pH, temperature, fish flour (FF), soybean meal (SM), solid culture, *Y. lipolytica*, proteases.

1 Introducción

Las proteasas (EC 3.4.21-24) representan cerca del 60 % de la producción mundial de enzimas de uso

industrial. Se encuentran distribuidas en la naturaleza y pueden ser obtenidas a partir de fuentes vegetales, animales y microbianas (Sandhya y col. 2005). Las proteasas microbianas juegan un papel importante

* Autora para la correspondencia. E-mail: lapb@xanum.uam.mx

en procesos biotecnológicos debido a su aplicación en alimentos (bebidas, panificación, ablandamiento de carne, etc.), industria farmacéutica (obtención de péptidos), en la industria de la curtiduría, tratamiento de aguas residuales y en detergentes, entre otros (Singh y col. 2008; Marcial y col. 2011).

El principal productor de proteasas ha sido el género *Bacillus* sp., sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de hongos filamentosos en la producción de proteasas. Existen reportes del uso de *Streptomyces* (De Azeredo y col. 2004), *Aspergillus* (Wu y col. 2006), *Penicillium* (Agrawal y col. 2004) y *Rhizopus* (Kumar y col. 2005); así como de *Aerobasidium pullulans* y *Yarrowia lipolytica* (Hernández-Martínez y col., 2010b). Se han reportado altos títulos de proteasa extracelular producidos por *Y. lipolytica* (Madzak y col. 2004), un ascomiceto aeróbico dimórfico obligado considerado no patógeno y aprobado como seguro o GRAS (Hernández-Martínez y col. 2010b).

El cultivo en medio sólido ha sido favorablemente utilizado para la producción de proteasas fúngicas debiéndose principalmente a que los hongos están naturalmente adaptados a crecer sobre superficies con bajo contenido de humedad. Dentro de las aplicaciones del cultivo sólido, se enumeran la producción de enzimas extracelulares con estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura (Sumantha y col. 2006; Ruíz-Leza y col. 2007, Flores-Flores y col. 2011). Desde el punto de vista industrial, se estima que el 30-40 % de los costos de producción de enzimas es debido al costo del medio de cultivo (Wang y col. 2005). Los procesos de cultivo sólido permiten emplear residuos sólidos agroindustriales de bajo costo y gran disponibilidad; por ejemplo: residuos de cáscara de camarón en polvo (Wang y col. 2008) y sus residuos (Ghorbel-Bellaaj y col. 2012); sardina en polvo (Sellami-Kamoun y col. 2011), residuos de curtiduría (Ravindran y col. 2011), harina de plumas y licor de maíz fermentado (De Azeredo y col. 2006).

En el proceso de cultivo sólido, las diferentes variables del proceso, como temperatura, pH, humedad, actividad de agua, naturaleza, disponibilidad y concentración del sustrato, aireación, tamaño de partícula, tiempo de incubación, entre otros, etc. (Thomas y col. 2013) pueden ser optimizados con apoyo de métodos estadísticos a fin de identificar los factores críticos y sus interacciones sobre la variable de interés. La temperatura y el pH son dos parámetros ambientales que afectan en gran medida los procesos de fermentación y/o la síntesis enzimática (Bhunia y

col. 2013). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del pH, la temperatura y la fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en cultivo sólido. Se utilizó como fuente de proteína y carbohidratos harina de pescado (HP) y harina de soya (HS).

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Y. lipolytica* (Laboratorio de Bioprocesos, Universidad Autónoma de Guadalajara). La cepa se conservó a -40 °C en una suspensión de glicerol-leche descremada. La cepa se propagó en agar papa dextrosa (PDA-Bioxon) a 45 °C por siete días. Las esporas se cosecharon con una solución estéril de Tween 80 (0.05 %) y se cuantificaron en cámara de Neubauer.

2.2 Preparación del soporte y sustrato

Para la producción de proteasas se utilizó harina de pescado (HP) y harina de soya (HS) como sustrato y perlita (P) como soporte inerte (Termolita, Nuevo León, México). La HP, HS y P se ajustaron a un tamaño de partícula de 0.42, 0.50 y 0.84 mm respectivamente. La P fue sometida a un pretratamiento que consistió en dos lavados secuenciales con agua caliente-fría y posteriormente se secó a 60 °C durante 72 h.

2.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo se formuló como se describe a continuación (g/L): KH_2PO_4 (1.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5), KCl (0.5) y FeSO_4 (0.01). La HP presenta una composición elemental (%) como se describe a continuación: Carbono (40.08), Nitrógeno (8.71) e Hidrógeno (6.44). Sin embargo, del 43.25 % de carbono, solo el 1.45 % son carbohidratos asimilables (Fenol-sulfúrico) (García-Gómez, 2008). Por otro lado, la HS está compuesta por: Carbono (42.20), Nitrógeno (7.23) e Hidrógeno (6.83).

Los diferentes valores de pH inicial se ajustaron como sigue: pH 5.0 (Buffer de acetatos 0.1 M), pH 7.0 (Buffer fosfatos 0.1 M) y pH 9.0 (Buffer Tris-HCl 0.1 M).

2.4 Condiciones de cultivo

Se utilizaron columnas de vidrio (3.5x12 cm) empacadas con 1.5 g de una proporción sustrato-soporte de 30/70 (p/p) previamente homogenizados con el medio de cultivo e inóculo (2×10^7 esp/g soporte seco), la humedad inicial se ajustó al 50 %. El cultivo en medio sólido se realizó a tres diferentes temperaturas (40, 45 y 50 °C) durante 48 h a un flujo de aire de 40 mL/min. Se tomó muestra cada 12 h y el extracto enzimático de cada columna se recuperó adicionando 10 mL de agua destilada a 4 °C por cada g de masa fermentada. La muestra se agitó (30 min) y filtró (Whatman No. 1). El filtrado se centrifugó (14000 g/15 min/4 °C) y se consideró al sobrenadante como el extracto proteolítico.

2.5 Procedimientos analíticos

Determinación de proteína y actividad enzimática

Se determinó el contenido de proteína soluble de acuerdo al método de Bradford (Bio-Rad protein assay). El contenido de proteína se determinó por el método de Kunitz (1947) modificado por Johnsvesly y col. (2002). Se preparó una solución de caseína (Hammerstein) al 1 % en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0. El extracto enzimático (50 μ L) se adicionó a 950 μ L de solución de caseína previamente atemperada a 35 °C. La mezcla se homogenizó e incubó durante 15 min a 35 °C; la reacción se detuvo por la adición de 1.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Se preparó un blanco en el cual se sustituyó el volumen del extracto enzimático por agua destilada y se le dio el mismo tratamiento que a las muestras. Adicionalmente se puso una alícuota de 950 μ L de solución caseína y se incubó a 35°C durante 15 min, se añadió 1.5 mL de TCA (5 %) y 50 μ L de extracto enzimático. La muestra se centrifugó (14000g/15 min/4 °C), se filtró el sobrenadante (Whatman No. 1) y se cuantificó la liberación de tirosina a una absorbancia de 280 nm. Se preparó una curva de calibración con tirosina (Sigma-Aldrich®) en un rango de 0 a 156 μ g/mL de tirosina en ácido clorhídrico 1 M. Una unidad de actividad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar un μ g de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño factorial 3x3x5 para determinar el efecto del pH, temperatura y tiempo sobre la actividad proteolítica de *Y. lipolytica* en cultivo sólido utilizando

dos sustratos diferentes (HS y HP). Los niveles empleados para cada factor a evaluar se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar el efecto del pH, temperatura y tiempo en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en cultivo sólido.

Variable	Unidad	Niveles				
pH		5	7	9		
Temperatura	°C	40	45	50		
Tiempo	h	0	12	24	36	48

Se obtuvo un total de 90 tratamientos para cada sustrato. Para el análisis de datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando el software PASW Statistics 18. Cuando fue necesario, se realizó una comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$).

3 Resultados y discusión

Se realizaron cultivos en medio sólido para evaluar la producción de proteasas por *Y. lipolytica* empleando HP y HS como sustrato y perlita como soporte inerte. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías para evaluar el efecto del pH, tiempo y temperatura sobre la producción de proteasas (Tabla 2).

Se observó que todos los factores evaluados; así como sus interacciones mostraron un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la producción de proteasas a partir de HP. La Figura 1 y 2 muestra el efecto del pH (a) y temperatura (b) empleando HP y HS como sustrato, respectivamente.

Se observó la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de HP (Fig. 1) en el rango de pH de 5 a 9; sin embargo, la máxima producción de proteasas se obtuvo a pH 7 a las 12 de cultivo (20 U/mL), valor 4.5 veces mayor al obtenido a pH 5 y 9 (Fig. 1a). El pH del medio influye en el crecimiento y metabolismo microbiano para producir enzimas, así como en la actividad y estabilidad de las mismas. Al utilizar HS (Fig. 2), la máxima actividad proteolítica (66 U/mL) se obtuvo a pH 7 y la actividad decrece cuando el valor de pH se ajusta por arriba o por abajo de 7 (Fig. 2a). Valores de pH similares han sido reportados como óptimos para la producción de proteasas por *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. nidulans* HA-10 y *Monascus*

purpureus (Hernández-Martínez y col. 2011a). Se ha reportado que la producción de proteasas fúngicas

está influenciada por el pH inicial del medio de cultivo,

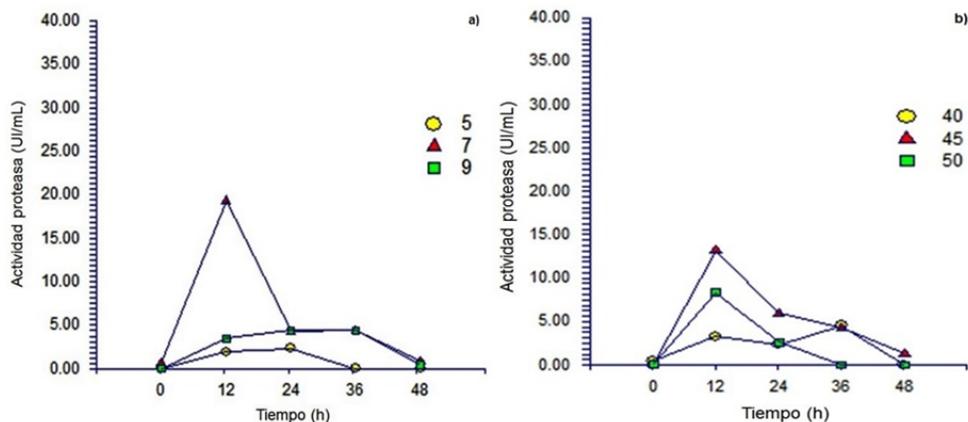


Fig. 1. Efecto del (a) pH 5 (●), 7 (▲) y 9 (■) y (b) temperatura 40 (●), 45 (▲) y 50 °C (■) en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de pescado.

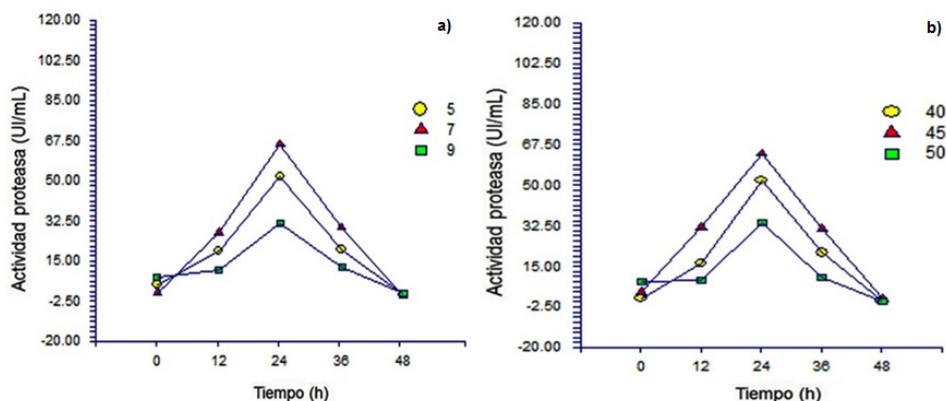


Fig. 2. Efecto del (a) pH 5 (●), 7 (▲) y 9 (■) y (b) temperatura 40 (●), 45 (▲) y 50 °C (■) en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de soya.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de la producción de proteasas a partir de harina de pescado (HP) o harina de soya (HS).

Sustrato	Origen	A	B	C	A*B	A*C	B*C	A*B*C
HP	F ₀	121.15	47.82	115.78	52.20	61.40	20.59	34.42
	Sig.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HS	F ₀	22.15	30.63	138.27	32.55	8.23	7.24	11.49
	Sig.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

a) R²= 0.98; b) A: pH, B: Temperatura, C: Tiempo

debido a su participación en los diversos procesos enzimáticos y de transporte necesarios para el crecimiento celular y metabolitos (Ellaiah y col. 2002; Kumar y col. 2008).

Una vez identificado el valor de pH que proporciona la mayor actividad proteolítica, se evaluó el efecto de la temperatura (40 a 50 °C). La máxima producción de actividad enzimática se obtuvo a 45 °C (Fig. 1b y 2b), bajos niveles de actividad se obtuvieron a 40 y 50 °C para ambos sustratos (HP y HS).

El uso de HS como fuente de proteína y carbohidratos proporcionó la mayor actividad proteolítica (67 U/mL) a un pH inicial de 7 a 45 °C, a las 24 h de cultivo (Fig. 2). En contraste, con la HP (Fig. 1) a las mismas condiciones de pH y temperatura proporcionó 14 U/mL como máxima actividad proteolítica a las 12 h de cultivo, valor 4.8 veces menor al obtenido con HS.

Se ha reportado que la máxima producción de proteasa alcalina por *A. flavus* IM1 327634 fue de 2.72 U/g sustrato obtenida a las 48 h utilizando salvado de trigo como sustrato, con mayor actividad a pH entre 7.5 y 9.5 (Malathi y col. 1991). García-Gómez y col. (2008) reportaron la máxima producción de proteasas a las 44 h de cultivo al utilizar HP. En este trabajo la mayor producción se obtuvo a las 24 h y 12 h utilizando HS y HP respectivamente, la reducción del 50-75 % del tiempo de fermentación representa una disminución significativa del costo total del proceso.

La temperatura óptima de producción encontrada en este estudio (45 °C) es similar a la reportada por Li y col. (2009) para proteasas de *Y. lipolytica*. Esto se explica debido a que la mayoría de las levaduras tienen una temperatura máxima de crecimiento entre 24-48 °C y una afinidad por medios ligeramente ácidos con un pH entre 4.5 y 6.5 (Déak y Beuchat, 1996). Los tiempos de máxima producción de proteasa observados en este trabajo (12 y 24 h con HP y HS, respectivamente) son más cortos que los reportados para la producción de proteasas por *A. oryzae* (García-Gómez y col. 2008), *Candida humicola* (Ray y col. 1992), *C. Buinensis* (Araujo y col. 2010) y *Y. lipolytica* (Hernández-Martínez y col. 2011b), quienes reportan la máxima producción de proteasas a las 44, 96, 48 y 36 h de cultivo respectivamente.

Yarrowia lipolytica presentó la capacidad de utilizar HP y HS como fuente de proteína y carbohidratos para su crecimiento y producción de proteasas, la máxima producción enzimática se obtiene a las 12 h empleando HP; en contraste al utilizar HS la máxima producción se alcanza a las 24 h. Sin embargo, los rendimientos son hasta 6.25 veces superiores al emplear HS, comparado con

aquellos obtenidos al emplear HP. Sandhya y col. (2005) reportaron el uso de salvado de trigo en la producción de proteasas de *A. oryzae*, obteniendo la mayor actividad proteasa (31.2 U/mL) a pH 7.5 y una temperatura de 30 °C, a un tiempo de cultivo de 72 h. Empleando la cepa *A. fumigatus* y harina de coraza de langosta como fuente de carbono, la mayor actividad proteasa obtenida fue de 1.1 U a pH 4, 37 °C y 144 h de cultivo (Wang y col. 2005). En el presente estudio, se observa una reducción del tiempo de máxima producción de proteasas en un 66.7 y 83.44 % comparado con lo reportado por Sandhya y col. (2005) y Wang y col. (2005) respectivamente. Asimismo, García-Gómez y col. (2008) y Hernández-Martínez y col. (2011b) reportaron la máxima producción de proteasas a partir de HP a las 44 y 36 h de cultivo respectivamente; en contraste con ese trabajo, el tiempo de máxima producción fue de 12 h a partir del mismo sustrato (HP), logrando una reducción en el tiempo de proceso del 73 y 66 % respectivamente. El notable acortamiento en el tiempo del proceso es de gran interés para la industria enzimática, ya que se disminuyen considerablemente los tiempos de operación, disminuyendo los costos del proceso.

En referencia al efecto de la temperatura (Fig. 4a) se observó un patrón clásico de relación temperatura-actividad, con una temperatura óptima de 45 °C, observándose una disminución de actividad a valores mayores o menores de dicha temperatura. La mayoría de las levaduras crecen de manera óptima a temperaturas de 24-48 °C, por encima de esta temperatura se comienza a perder estabilidad en la producción enzimática (Déak y Beuchat, 1996). Adicionalmente, el cultivo en medio sólido limita los fenómenos de transferencia de energía generando problemas para remover el calor generado, ocasionando un sobrecalentamiento y, por ende, una mayor pérdida de humedad del medio, limitando la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del microorganismo; motivo por el cual no es conveniente utilizar temperaturas mayores a 45°C durante los procesos en cultivo sólido (Graminha y col. 2008).

Debido a la diferencia de unidades en las que se reporta la actividad enzimática entre los diferentes autores, no es factible hacer una comparación directa entre los títulos de actividad producidos. La mayor producción de actividad enzimática se obtuvo a pH inicial de 7 (Fig. 4b), observando que a pH 5 y 9 se presenta una notable reducción en la producción de proteasas, por lo cual se considera la producción de una proteasa neutra. Hernández-Montañez y col. (2007) reportaron que *Y. lipolytica* posee genes

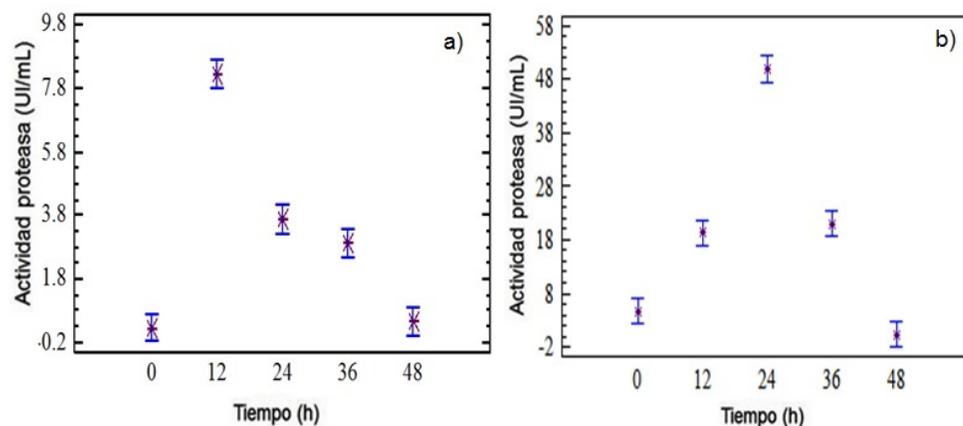


Fig. 3. Efecto del tiempo en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de pescado (a) y harina de soya (b).

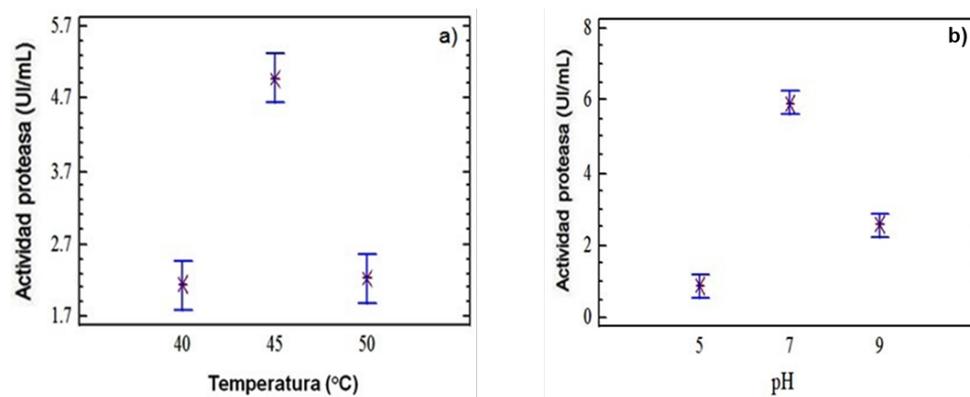


Fig. 4. Efecto del a) temperatura y b) pH en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de pescado

recombinantes que son capaces de generar los tres tipos de proteasas: ácidas, neutras y alcalinas; por lo que es posible considerar que las proteasas producidas por *Y. lipolytica* bajo las condiciones de cultivo sólido descritas en este trabajo sean mayoritariamente neutras, dependiendo del pH inicial (Niyonzima y More, 2013; Sumantha y col. 2006).

Una vez obtenidos los valores de pH (7) y temperatura (45 °C) que proporcionan la mayor producción de proteasas, se realizó un ANOVA fijando el tiempo a 12 h para HP y 24 h para HS, los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4 para HS y HP respectivamente. El ANOVA resultante para HS (Tabla 3) no presentó términos significativos y la R^2 fue de 33.5%. Esto indica que en el tiempo máximo de producción enzimática con HS no se tiene efecto del pH y temperatura, por lo que los niveles de mayor actividad elegidos del ANOVA de tres vías se consideran como los valores que logran las mejores

condiciones usando Harina de Soya como sustrato.

En contraste, en el ANOVA de HP (Tabla 4) la variable que más influye en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en cultivo sólido empleando HP es el pH ($p \leq 0.05$). Lo anterior indica que un ligero cambio en el valor de pH puede provocar un aumento o descenso notable en la producción de proteasas. El modelo tiene al menos un efecto significativo, por lo cual se concluye que se presenta un efecto del pH en el término cuadrático para el tiempo de máxima producción enzimática.

Los datos obtenidos del ANOVA para HP permitieron generar una superficie de respuesta estimada. Los datos fueron ajustados mediante regresión múltiple a una ecuación polinomial de segundo orden (HP, Ec.1), originando un modelo que indica la relación empírica entre la variable dependiente (actividad proteasa, Y) y las variables

Tabla 3. Análisis de varianza de la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de soya.

Fuente	SC	GL	CM	F ₀	Valor P
A:pH	1238.50	1	7.36	1.07	0.3240
B:Temperatura	1002.11	1	76.01	0.86	0.3729
AA	2341.43	1	1091.20	2.02	0.1834
AB	117.81	1	52.02	0.10	0.7561
BB	1711.75	1	217.07	1.47	0.2502
Bloques	33.538	1	1.62	0.03	0.8682
Error	12779.00	11	1161.73		
Total	19224.20	17			

*R²=33.52 %

Tabla 4. Análisis de varianza de la producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de harina de pescado.

Fuente	SC	GL	CM	F ₀	Valor P
A:pH	7.36	1	7.36	0.08	0.7865
B:Temperatura	76.01	1	76.01	0.79	0.3917
AA	1091.20	1	1091.20	11.41	0.0062
AB	52.02	1	52.02	0.54	0.4762
BB	217.07	1	217.07	2.27	0.1600
Bloques	1.62	1	1.62	0.02	0.8988
Error	1051.69	11	95.61		
Total	2496.96	17			

*R²=57.88 %

independientes (pH y temperatura) para HP.

$$Y_{HP} = -719.918 + 46.725A + 25.238B - 4.129A^2 + 0.255AB - 0.295B^2 \quad (1)$$

Donde: HP= Harina de pescado; A= pH; B= Temperatura

La Fig. 5 muestra la respuesta de la interacción pH-temperatura empleando HP como fuente de carbono a un tiempo de cultivo de 12 h. La máxima producción de proteasa bajo estas condiciones fue

predicha en 24.41 U/mL, correspondiendo a pH 7 a 45 °C. La curva además sugiere que ligeros cambios en el pH o temperatura de incubación producen diferencias notables en la variable de respuesta; sin embargo, el ajuste solo explica el 57.88 % del modelo. Lo anterior indica que aún en las condiciones del tiempo de máxima producción, el modelo permite estimar una aproximación del nivel óptimo de temperatura y pH. Bajo condiciones predichas por el modelo, se obtuvo una actividad proteolítica experimental de 38.59±2.48 U/ml.

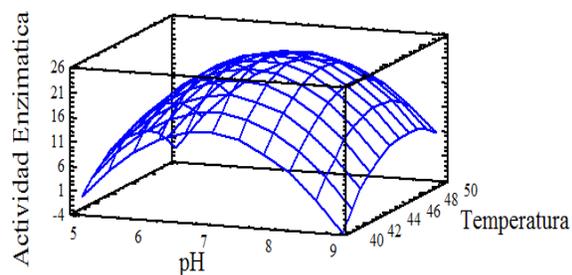


Fig. 5. Superficie de respuesta en la producción de proteasas por *Y. lipolytica*, se muestra la interacción entre pH-temperatura después de 12 h de cultivo en medio sólido a partir de harina de pescado.

El valor experimental fue superior al predicho por el modelo debido al poco ajuste de los datos al modelo, lo cual puede ser debido a que no se están considerando otros factores que puedan influir en la producción de la proteasa, tales como la diferente composición de minerales, así como la relación C/N.

La síntesis de enzimas fúngicas está fuertemente influenciada por el tipo de cepa, composición del sustrato y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (Elisashvili y col., 2008; Elisashvili y Kachlishvili, 2009). Entre los parámetros de cultivo, la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) es uno de los factores fundamentales en la regulación metabólica entre la producción de biomasa y biomoléculas; dependiendo del metabolito de interés (biomasa o biomolécula) el radio C/N debe ser establecido. El exceso o falta de nitrógeno en el sustrato puede ser una limitante para el crecimiento del hongo; pero no así para la producción de cierto tipo de enzimas fúngicas (Rajarathnam y Bano, 1989). Se reportado que la producción de proteasas extracelulares, no asociadas al crecimiento está modulada por un sistema inductor regulado en función del radio C/N (De Azeredo y col., 2003). La HS usada en este trabajo presentó un C/N de 6.11, mientras que la HP presentó un C/N de 4.6, lo cual indica que a mayor C/N, mayor es la producción de proteasas bajo las condiciones evaluadas en este trabajo. Actualmente se está estudiando el efecto de la relación C/N en la producción de proteasas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que es posible acortar los tiempos de producción de proteasas por *Y. lipolytica* a partir de HP y HS, proporcionando un proceso económico y rentable en función del costo del sustrato (USD \$ 0.8 kg) y tiempo de proceso.

La mayor producción de proteasas (105.2 U/mL) se obtiene empleando HS a un pH inicial de 7, temperatura de 45 °C y un tiempo de cultivo de 24 h. El tiempo máximo de producción se redujo hasta un 83.4 % comparado con los reportados en la literatura para sustratos y procesos similares. La reducción del tiempo del proceso de producción de proteasas tiene un impacto directo en el costo total del proceso; a menor tiempo de proceso menor será el costo de producción de la enzima. El modelo obtenido para HS indica que las variables estudiadas no presentan efecto significativo sobre la producción de proteasas por *Y. lipolytica*. En el caso de HP se observó un efecto significativo del pH. Es recomendable profundizar el estudio tomando en cuenta otras variables (relación C/N, nivel de inóculo, enriquecimiento del medio, etc) que pueden tener un efecto positivo en el aumento de la producción de proteasas por *Y. lipolytica*.

Referencias

- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T. y Patil, S. (2004). Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry* 39, 977-981.
- Araújo, V.D., Albuquerque, C., Neves, R.P., Mota, C.S., Moreira, K.A., Lima-Filho, J.L., Cavalcanti, M.T.H., Converti, A., Porto y A.L.F. (2010). Production and stability of protease from *Candida buinensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 830-842.
- Bhunia, B., Basak B., Bhattacharya, P. y Dey, A. (2013). Process engineering studies to investigate the effect of temperature and pH on kinetic parameters of alkaline protease production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115, 86-89.
- De Azeredo L.A.I., Castilho-Leda, R., Leite-Selma, G.F., Coelho, R.R.R, Freire, D.M.G. (2003). Protease Production by *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado Soil. Optimization of Culture Medium Employing Statistical Experimental Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 108, 749-755.
- De Azeredo, L.A.I., De Lima, M.B., Coelho, R.R.R, y Freire, D.M.G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using

- feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology* 53, 335-339.
- De Azeredo L.A.I., Freire, D.M.G., Soares, R.M.A., Leite, S.G.F. y Coelho, R.R.R. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 354-358.
- Déak, T. y Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Raton, Florida. EUA.
- Elisashvili, V. y Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144, 37-42.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresouce Technology* 99, 457-462.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2002). A review on microbial alkaline proteases. *Journal of Scientific & Industrial Research* 61, 390-704.
- Flores-Flores T.C., Gutiérrez-Rojas, M., Revah, S., Favela-Torres, E. (2011). Comparative study for oxygenases produced by *Aspergillus niger* ATCC 9642 in solid state and submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 189-2017.
- García-Gómez, M.J. (2008). *Comparación entre un extracto comercial y un extracto proteolítico fúngico producido por fermentación en medio sólido*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
- García-Gómez, M.J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. y Prado-Barragán, L.A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry* 112, 604-608.
- Ghorbel-Bellaaj, O., Manni, L., Jellouli, K., Hmidet, N. y Nasri M. (2012). Optimization of protease and chitinase production by *Bacillus cereus* SV1 on shrimp shell waste using statistical experimental design. Biochemical and molecular characterization of the chitinase. *Annals of Microbiology* 62, 1255-1268.
- Graminha, E.B.N., Gonçalves, A.Z.L., Pirola, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Da Silva, R., Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science Technology* 144, 1-22.
- Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C.W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., Regalado-González, C. y Prado-Barragán, L.A. (2011a). Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 46, 2001-2006.
- Hernández-Martínez, R., Sancho-Solano, A., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Regalado-González, C., Huerta-Ochoa, S. y Prado-Barragán, L.A. (2011b). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease produced by *Yarrowia lipolytica*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 333-341.
- Hernández-Montañez, Z.H., Araujo-Osorio, J., Noriega-Reyes, Y., Chávez-Camarillo, G. y Villa-Tanaca L. (2007). The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. *FEMS Microbiology Letters* 268, 178-186.
- Hernández-Samano, A.C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltran, A., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdoba, A.F., Torrez-Llañez, M.J., Guerrero-Legarreta, I. (2015). Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el Golfo de California, México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 35-47.
- Johnvesly, B., Manjunath, B., Naik, G.R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline from a thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technology* 82, 61-64.

- Kumar, A.G., Nagesh, N., Prabhakar, T.G., Sekaran, G. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology* 99, 2364-2372.
- Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R. y Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry* 40, 1701-1705.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline Soybean Tripsin Inhibitor: II. General Properties. *Journal of General Physiology* 30, 291-310.
- Li, J., Chi, Z., Wang, X., Peng, Y. y Chi Z. (2009). The selection of alkaline protease-producing yeasts from marine environments and evaluation of their bioactive peptide production. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27, 753-761.
- Marcial, J., Pérez de los Santos, A.I., Fernández, J.F., Días-Godínez, A.M., Montiel-González, A.M., Tomasini, A. (2011). Caracterización de una Asparto proteasa producida por *Amylomyces rouxii*. *Revista de Ingeniería Química* 10, 9-16.
- Madzak, C., Gaillardin, C. y Beckerich, J.M. (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109, 63-81.
- Malathi, S. y Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied Environmental Microbiology* 57, 712-716.
- Niyonzima, F.N. y More, S.S. (2013). Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* GR. Under submerged fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4, 1016-1028.
- Rajarathnam, S., y Bano, Z. (1989). Pleurotus Mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 31-113.
- Ravindran, B., Ganesh, K.A., Aruna, B.P.S. y Sekaran, G. (2011). Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste. *Current Science* 100, 726-730.
- Ray, M., Devi, K., Kumar, S. y Shivaji, S. (1992). Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied Environmental Microbiology* 58, 1918-1923.
- Ruíz-Leza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel J. C. y Aguilar, C. N. (2007). Bio-reactors design for solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6, 33-40.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. y Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40, 2689-2694.
- Sellami-Kamoun, A., Ghorbel-Frikha, B., Haddar, A. y Nasri, M. (2011). Enhanced *Bacillus cereus* BG1 protease production by the use of sardinelle (*Sardinella aurita*) powder. *Annals of Microbiology* 61, 273-280.
- Singh, S., Sczakas, G., Soccol, C. y Pandey A. (2008). Production of Enzymes by solid-state fermentation. En: *Current Developments in Solid-state Fermentation*. (A. Pandey, C. Soccol y C. Larroche eds), Pp. 183-204. Springer New York, EUA.
- Sumantha, A., Larroche, C. y Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44, 211-220.
- Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojevi, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 65-73.
- Thomas, L., Larroche, C. y Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81, 146-161.
- Vijayaraghavan, P., Lazarus, S. y Vincent, S.G.P. (2014). De-hairing protease production by

- an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi Journal of Biological Science* 21, 27-34.
- Wang, S.L., Chen, Y.H., Wang, C.L., Yen, Y.H. y Chern M.K. (2005). Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 660-665.
- Wang, S.L., Hsu, W.T., Liang, T.W., Yen, Y.H. y Wang, C.L. (2008). Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Bioresource Technology* 99, 5679-5686.
- Wu, T.Y., Mohammad, A.W., Jahim, J.M. y Anuar, N. (2006) Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1223-1229.