

Proteasas sintetizadas por microorganismos utilizadas en la producción de quesos

Efraín A. García

División de Biotecnología Fundación Ciepe
ORCID:0000 0003 2973 7949
efrainagarcia6418@gmail.com
Yaracuy-Venezuela

Belkis Tovar

División de Biotecnología Fundación Ciepe
ORCID:0000 0002 8407 2313
belkismonsa@gmail.com
Yaracuy -Venezuela

Darlene Peralta

División de Biotecnología Fundación Ciepe
ORCID:0000 0001 6700 192X
darlene-yohana@hotmail.com
Yaracuy -Venezuela

Dioselauren Hernández

División de Biotecnología Fundación Ciepe
ORCID:0000 0002 4301 2576
dioselaurenhernandez@gmail.com
Yaracuy -Venezuela

Fecha de recepción: 26-10-2020

Fecha de aceptación: 28-11-2020

Resumen

Las proteasas son elementos fundamentales en las actividades fisiológicas de los seres vivos, vegetales, animales, bacterias, hongos y virus, es allí donde su presencia es significativa, tanto en la vida como en la muerte, tanto en la reproducción como en la descomposición. Las proteasas actúan de manera específica sobre enlaces peptídicos que conforman a las proteínas y polipéptidos, están clasificadas dentro del grupo de las hidrolasas, por su forma de acción pueden ser exopeptidasas o endopeptidasas, por su pH pueden ser ácida, neutra o alcalinas, depende del aminoácido o elemento presente en su sitio activo. Son muy versátiles en su aplicación, el farmacéutico, alimentario, el químico, siendo el primero de ellos el de mayor importancia a nivel de investigación, por lo que implica para la salud del ser humano. Las

proteasas de interés en el mundo actual está siendo investigada y producidas bajo condiciones controladas a partir de microorganismos, siendo las bacterias las mayor aprovechamiento por su forma de cultivo en fermentación sumergida, es más fácil de controlar, escalar y recuperar. El interés de la investigación está enfocada en la disminución de los costos utilizando sustratos económicos, mejorar los rendimientos de producción y en el uso de la bioinformática a través de las herramientas omica, proteómica y ADN recombinante para encontrar la especie más productiva, más específica, más resistente. En esta revisión se evidencia trabajos desarrollados en la producción de proteasas y la aplicación de las mismas especialmente en el campo de la producción de quesos.

Palabras clave:
*Proteasa; péptidos; caseína;
hongos; aspártico*



Proteases synthesized by microorganisms used in the production of cheeses

Abstract

Proteases are fundamental elements in the physiological activities of living beings, plants, animals, bacteria, fungi and viruses, where their presence is significant, both in life and in death, both in reproduction and in decomposition. Proteases specifically attitudes on peptide bonds that make up proteins and polypeptides, are classified within the group of hydrolases, due to their form of action they can be exopeptidases or endopeptidases, due to their pH they can be acidic, neutral or alkaline, depending on the amino acid or element present on your active site. They are very versatile in their application, the pharmaceutical, food, chemical, being the first of them the most important at the re-

search level, so it implies for human health. Proteases of interest in today's world are being investigated and produced under controlled conditions from microorganisms, with bacteria being the best use for their culture in submerged fermentation, it is easier to control, scale and recover. The research interest is focused on decreasing costs using economic substrates, improving production yields and on the use of bioinformatics through omics, proteomics and recombinant DNA tools to find the most productive, most specific species, more resistant. This review evidences works developed in the production of proteases and their application, especially in the field of question production.

Keywords:

Protease; peptides; casein; fungi; aspartic



Introducción

Las proteasas son enzimas que catalizan reacciones de ruptura molecular en los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos entre sí, que conforman a las proteínas, están presente en todos los seres vivos desde el nivel macroscópico hasta el nivel microscópico y forman parte del sistema regulador fisiológico de la célula, pero también son segregadas al medio exterior y es allí donde en el campo de explotación comercial entra en juego, en el sentido de recuperar, extraer y aislar y de esta manera ser utilizada de manera práctica en investigación en primer plano y para darle un valor agregado en aplicaciones tecnológica bien sea para desarrollo de productos para consumo humano, y su amplia aplicación como uso tecnológico y para uso farmacéutico. De allí la esencia de conocer, entender y poder proyectar no solo su importancia si no su potencial que se pierde de vista por su amplio campo de aplicación y su gran demanda.

Los microorganismos por su forma de crecer, se pueden controlar y es una de las vías y herramientas más prácticas que permiten hacer uso de la misma y aprovechar todo este bagaje de conocimiento con el cual se puede proyectar para la producción de este producto biológico en favor de la humanidad en todos sus aspectos.

En el plano alimentario, el

queso es un producto de consumo masivo, fundamental por su contenido proteico, elemento esencial para la nutrición de los seres vivos, su producción implica la utilización de proteasas que insolubilizan a la caseína con lo cual se crean dos fases, para luego dar lugar a la elaboración de queso, el cual se conserva por mayor tiempo y se puede comercializar en grandes volúmenes.

Las proteasas de origen microbiana más adecuada para insolubilizar la caseína de la leche, son la aspártica, las cuales son del tipo ácido, son específica en la ruptura de la k-caseína y son producidas por hongos filamentosos.

El desarrollo de esta investigación documental, está basada en conocer el mundo de las proteasas, cómo se definen, como se clasifican, que las diferencian, sus aplicaciones, el estado del arte en que está inmersa hoy en día la producción de proteasa en especial en el campo alimentario haciendo énfasis en la producción de quesos.

Desarrollo

En condiciones fisiológicas, las células humanas expresan aproximadamente 10.000 proteínas que deben plegarse adecuadamente para llevar a cabo sus funciones biológicas como

lo resalta Tundo et al, (2020); Partiendo de esto, se tiene una visión de cómo la célula es una unidad simple, pero con mecanismos reguladores tan complejos y diversos, en la cual deriva la importancia de los sistemas enzimáticos, se podría alegar que, sin las enzimas sería imposible la existencia de la vida, sin dejar de pensar que la misma es un sistema, de allí la diatriba en el escenario científico cuando se plantea la hipótesis que los virus no son seres vivos, siendo fundamental para su existencia la intervención de las proteasas para su replicación.

Las enzimas

Las enzimas son proteínas, de estructura tridimensionales poliméricas las cuales están formadas por unidades simples de aminoácidos, unidos entre sí mediante enlaces covalente, denominados peptídicos, lo particular de las enzimas es que llevan a cabo reacciones de catálisis químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su estructura tridimensional. En esta conformación hay la presencia de cavidades, llamadas sitio activo, las cuales muestran afinidad por moléculas específicas denominadas sustratos, específicamente en el caso que aquí concierne, el de las proteínas, o en menor tamaño los péptidos, estas moléculas se degradaran generando



un producto de menor tamaño con propiedades específicas. La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de reacciones o interacciones covalentes y no covalentes entre la enzima y el sustrato, que hacen que se dé la transformación de éste en un producto. Como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis (Ramírez y Ayala; 2014).

Se conocen casi 4.000 enzimas, y de ellas, se utilizan comercialmente aproximadamente 200 de origen microbianas. Sin embargo, solo se producen unas 20 enzimas a escala industrial. Con un mejor entendimiento de la bioquímica para la producción de enzimas, los procesos de fermentación y los métodos de recuperación, se prevee un número creciente de enzimas industriales. La demanda mundial de enzimas es satisfecha por unos 12 productores y 400 proveedores. Casi el 75% del total de las enzimas son producidas por tres compañías, la Novozymes, con sede en Dinamarca, la DuPont, con sede en EE. UU. La cual adquirió a Danisco en Dinamarca en mayo de 2011 y Roche, con sede en Suiza. El mercado es altamente competitivo, tiene pequeños márgenes de ganancia y es tecnológicamente intensivo. Se estimó que el

mercado mundial de enzimas aumentaría en un 7 por ciento a un ritmo de \$ 8.0 mil millones para el año 2015, las ganancias reflejan en el tiempo un continuo repunte en la economía mundial (Li et al; 2012).

Proteasas

Específicamente en el campo de las enzimas, las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Tienen un rol fisiológico e industrial, su rol fisiológico va desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta formar los aminoácidos, los cuales a través de las diferentes rutas metabólicas en la célula pueden ser sintetizadas y estar involucradas en las reacciones catabólicas y anabólicas de la célula, así como en la participación en procesos como por ejemplo, la coagulación de la sangre donde interviene la enzima trombina clasificada como una serin proteasa. Se encuentran naturalmente en organismos vivos, donde se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas. Son producidas por los seres vivos, vegetales, animales y microorganismos como hongos, bacterias y participan en la replicación de los virus.

Los microorganismos producen una gran variedad de enzimas, la mayoría de las cuales son generadas en cantidades relativamente bajas, las enzimas están involucradas en procesos fisiológicos de las cé-

lulas. Hay enzimas que igualmente son excretadas fuera de la célula. Las enzimas tienen usualmente la función de romper moléculas poliméricas a nivel de los enlaces peptídicos. Los productos de la degradación de las proteínas, péptidos y aminoácidos son utilizados por el microorganismo como fuente alimenticia y lo utilizan para llevar a cabo su propio metabolismo, para su crecimiento, reproducción, actividades fisiológicas y producción de biomasa.

Existen muchas enzimas importantes de producción industrial en el mercado internacional, la proteasa es una de ellas, son obtenidas utilizando los procesos de fermentación. Este es un proceso que se puede definir como una operación unitaria que consiste en la transformación biológica de materias primas en bioinsumos, mediante la utilización de microorganismos.

En el mercado de las enzimas industriales las proteasas forman parte de uno de los tres grupos de enzimas más utilizados en la industria, representan el 20 % del 60 % total de enzimas a nivel mundial y este mercado se incrementa significativamente cada año y esto obedece al amplio campo de aplicación que tiene en diferentes industria (Kumar and Takag, 2000).

Se estima que las proteasas representan entre el 1 y el 5%

del genoma de los organismos infecciosos y el 2% del genoma humano (Puente et al., 2003). Los diferentes procesos fisiológicos, como la reproducción, el nacimiento, el envejecimiento y hasta la muerte están regulados por proteasas. Las proteasas son vitales en la imitación y propagación de enfermedades infecciosas y, debido a su importante papel en el ciclo de vida, son imprescindibles para el descubrimiento de drogas. Están involucradas en los procesos normales y fisiopatológicos. Esta participación las ha llevado a producir enfermedades mortales, como el cáncer, el SIDA (Rawlings et al., 2004).

Las proteasas son enzimas del tipo hidrolasas también denominadas peptidasas o proteolíticas, están íntimamente relacionadas a los procesos biológicos vitales, lo que hace imaginar su importancia, incluso en el caso de los organismos más simples y su asociación con procesos evolutivos. El rango de variantes y especificidad que presentan, son el reflejo de sus modificaciones evolutivas que han sufrido a través del tiempo.

Las enzimas en general están divididas en seis clases y las proteasas se clasifican en la clase número 3, el cual está conformado por el grupo de las hidrolasas, está inmersa en la subclase 3.4., en función del tipo de sustrato sobre el que actúan, ya que tienen en común la hidrólisis sobre

los enlaces peptídicos. Existen además 13 subclases las cuales están asociadas al tipo de reacción catalítica.

Existen otras formas de clasificación en función de su estructura químicas, lo cual suministra información sobre el origen de la evolución familiar, existe una base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) que tiene como objetivo satisfacer esta necesidad. Es de tipo organizativo, de una base de datos con una clasificación jerárquica en la que los conjuntos homólogos de las proteínas de interés se agrupan en familia y las familias homologas se agrupan en clanes. Cada peptidasa, familia y clan tienen un identificador único. La base de dato se ha empleado recientemente para incluir los inhibidores de las peptidasas y estos se clasifican de manera muy similar a las peptidasas, en función de la estructura tridimensional de la proteína y sus sitios catalíticos. Cada clan proporciona información sobre la estructura catalítica de las proteasas. Los nombres que adoptan las enzimas está relacionado al aminoácido representativo o al metal presente o al elemento icono ubicado en el sitio activo: Peptidasas aspárticas (A), Cisteína peptidasas (C), Metalo peptidasas (M), serina peptidasas (S), tipo catalítico mixto (P) y tipo desconocido (U). (Rawlings et al; 2004).

La estructura de conformación alrededor del sitio acti-

vo de la proteasa, determina cómo el sustrato, puede unirse al centro activo de la enzima. La superficie de la proteasa que se acopla a la cadena del sustrato se le denomina subsitio y determina la especificidad del sustrato a la proteasa. Sin embargo, aunque la mayoría las enzimas presentan una cadena o estructura grande y compleja, solo unos pocos aminoácidos están involucrados en el sitio activo. Por ejemplo la quimiotripsina, es una serinproteasas, bien conocida por su relación geométrica clásica de triada catalítica, existente entre los aminoácidos Aspartico102, Histidina 57 y Serina 195. (Tavano, 2013).

Las proteasas pueden clasificarse en dos grupos según su zona de acción sobre la cadena polipeptídicos, las exopeptidasas y endopeptidasas. También existe otra forma de clasificación, pero basada en la zona del pH óptimo en el cual actúa la enzima, es decir, proteasas ácidas: pH óptimo por debajo de 7,0 dentro del rango 2,0 y 5,0; proteasas alcalinas: pH óptimo por encima de 7.0 y proteasas neutras: pH óptimo alrededor de 7.0. Las proteasas son específicas en el sustrato al cual se acopla, sitio activo, mecanismo catalítico, pH, temperatura óptima. El conocimiento de estas características es de vital importancia para explotar de manera exitosa su aplicación industrial como biocatalizadores. (Sethi et al; 2016).



Los microorganismos y las proteasas

Partiendo del hecho de que los microorganismos, por ser seres vivos, por contar con un código genético, con un proceso de reproducción celular, contar con la presencia de organelos citoplasmáticos, en su célula se llevan a cabo reacciones metabólicas catabólicas y anabólica, dentro de las cuales son fundamentales la presencia de las enzimas, y las proteasas entran en juego ejecutando acciones específicas tanto a nivel celular como en la segregación extracelular.

Proteasas de origen bacterianas

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares, que se encuentran en casi todas las partes de la Tierra. Son vitales para los ecosistemas del planeta. Algunas especies pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura y presión. El cuerpo humano está lleno de bacterias, de hecho se estima que contiene más bacterias que células humanas. Las proteasas son enzimas sintetizadas intracelulares y extracelularmente por bacterias y hongos para sus funciones fisiológicas. Las proteasas de origen bacteriana, específicamente las derivadas del *Bacillus* sp. Son las enzimas industriales más ampliamente explotadas comercialmente con gran aplicación en las formulaciones de detergentes.

Estas enzimas se han utilizado por esta industria desde 1914 como aditivo. En los últimos 30 años, la importancia de las proteasas en detergentes ha pasado de ser aditivos a ser parte importante dentro de su formulación. Entre las proteasas comerciales existente se encuentran la Subtilisina Carlsberg, Subtilisina BPN, Alcalase, Esperase y Savinase. Estas proteasas han sido producidas con éxito de diferentes fuentes de microorganismos. Las proteasas alcalinas microbianas dominan el mercado mundial de enzimas, lo que representa una participación de dos tercios de la industria de los detergentes. Desde el advenimiento de la enzimología, las proteasas microbianas han sido las enzimas más ampliamente estudiada. (Beg and Gupta, 2003).

Las proteasas han ganado interés, no solo por su papel vital en las actividades metabólicas, sino también por su inmensa utilización en diversas industrias. La razón por la cual las proteasas disponibles en el mercado son en mayor cantidad de origen microbiano, obedece a su alto rendimiento, los tiempos de producción son menores, requiere de espacios reducidos, se han logrado buenos resultados con la manipulación genética y la rentabilidad es superior, lo que las ha hecho atractiva su alta demanda y utilización en el mercado.

Las proteasas de origen microbianas son más requeridas

que las proteasas derivadas de plantas vegetales como papaína de la lechosa y bromelina de la piña, así como las obtenidas a partir de animales como es el caso de las pancreáticas obtenidas de porcino o la renina del estómago de rumiantes, y esto obedece a que estas enzimas en sustitución, reúne las características deseadas para aplicaciones industriales y lo más atractivo es que su forma de producción es más fáciles de controlar en tiempo y espacio. Para reducir el costo de producción, el uso de sustratos abundante disponibles y económicos están llamados a ser evaluados para la producción de enzimas. De allí la abundante investigación existentes en el uso de desechos agrícolas (Sathishkumar et al., 2014).

Los productos biofarmacéuticos existentes en el mercado, tales como los anticuerpos, las hormonas, factores de crecimiento, interferones, interleucinas, insulina, penicilina G acilasa, estreptavidina y diferentes quinasas representan aproximadamente una quinta parte de los productos farmacéuticos producidos. Las bacterias específicamente las cepas de *Bacillus* son los que revisten mayor interés para la producción por la vía de ADN recombinante, técnica establecida desde hace mucho tiempo para la producción biotecnológica de proteínas, para ello hacen uso de técnicas como cultivo en placas, micro titulación, matraces agitados, biorreactores por



lotes, por lote alimentado y en proceso continuo, aquí entra en juego la herramienta ómica y la proteómica con enfoques prometedores, llevando a los *Bacillus* hacia la aplicación industrial para la producción de proteínas farmacéuticas recombinantes. (Lakowitz et al; 2018).

Las proteasas intracelulares, juegan un papel vital en el recambio de proteínas, en la regulación hormonal y en la disponibilidad del conjunto de proteínas celulares, mientras que las proteasas extracelulares tienen su importancia significativa en su utilización y aplicación en la hidrólisis de proteínas, para la producción de péptidos y aminoácidos de gran interés en el campo alimentario (Adrio and Demain, 2014).

Las utilizaciones de enzimas de origen microbianas se ven favorecidas especialmente porque pueden ser producidas de forma masiva y ofrece una variedad de propiedades que permiten la selección de las condiciones más adecuadas para su aplicación.

Proteasas secretadas por hongos

Los hongos del latín fungus, es un organismo del grupo de los eucariotas que pertenece al reino Fungi. Los hongos forman un grupo polifiletico, es decir no tienen un antepasado común a todos los miembros

y son parásitos o viven sobre materia orgánica en descomposición.

Las proteasas ácidas

Los hongos es el género más relevante conocido para la excreción de proteasas, del tipo ácidas, las cuales son las más adecuadas para ser utilizadas en la industria de los alimentos, se caracterizan por que son estables y activas en un rango de pH que se mueve entre 3,8 y 5,6. Los microorganismos que se han identificados productores de proteasas específicas para actuar en medio ácido, pH menores a 7.0, son las excretadas por hongos filamentosos, de allí que basado en esta característica son las más adecuadas para ser utilizadas en el campo de los alimentos, es por eso que se utiliza para elaborar queso, partiendo de que el punto isoeléctrico de precipitación de la k - caseína de la leche está ubicado en el valor de pH 4,6; además su utilización en la preparación de salsa de soja, hidrolizado de proteínas, ayudas digestivas, material para condimentar. Entre otras aplicaciones, las proteasas ácidas también se utilizan en la clarificación de jugos de fruta, para mejorar la textura en la masa y pasta en panificación por hidrólisis del gluten lo cual también contribuye para dietas especiales, también se utiliza en el ablandamiento de la carne, para eliminar la turbidez que se genera en frío en la cerveza como consecuencias de la

presencia de péptidos, con esto se logra mejorar la clarificación de cervezas, también para eliminar el sabor en algunos tipos de bebidas de frutas y alcohólicas (Zhang et al; 2010).

Las proteasas aspárticas se han utilizado en la clarificación de jugos de frutas. Hay un estudio de investigación donde se identificó un nuevo gen de proteasa aspártica (TIAP) derivada del *Talaromyces leycettanus* JCM12802; se expresó de forma heteróloga a partir del hongo *Pichia pastoris*. Usando caseína como sustrato, el TIAP recombinante purificado, mostró actividades óptimas a pH 3,0 y 55 °C; con una actividad específica de $1.795,4 \pm 62,8U$ / mg, y se mantuvo estable en un rango de pH dentro del rango de 3,0-6,0; a temperaturas por debajo de 45 °C. Además, la enzima mostró ser altamente resistente a la mayoría de los iones metálicos y reactivos químicos, a excepción del Fe+3 y al β -mercaptoetanol. Cuando se agregó al jugo a base de manzana, naranja, uva y kiwi, mostró una excelente actividad proteolítica contra las proteínas formadoras de turbidez, disminuyendo la turbidez hasta un 49,9 unidades de turbidez de nefelometría (NTU). Estas propiedades enzimáticas crean un potencial favorable para el uso de la TIAP en la industria de jugos de frutas. (Guo et al; 2019).

De los hongos más utilizados en la producción de pro-



teasas para aplicaciones en la industria alimentaria se encuentran el *Aspergillus oryzae*, y el *Rhizomucor miehei* en especial por su gran relevancia en la producción de cuajo para la industria quesera. (Copetti; 2019).

En trabajo de investigación desarrollado por Prezzi et al, (2018) hace mención que la hidrólisis de la caseína de la leche da como resultado péptidos con propiedades inmunomoduladora, antioxidante, antihipertensiva, antitrombótica, anticancerígena y acciones inhibitorias de enzimas, de allí su importancia como tratamiento terapéutico y su producción como producto para la industria farmacéutico, investigaciones que hoy día llevan la vanguardia en los países desarrollados.

Las proteasas de ácido aspártico, también conocida como aspartil proteasas o proteasas ácidas, son del tipo endopeptidasas y dependen de dos residuos de ácido aspártico ubicados en el sitio activo, para su actividad catalítica, localizados en dos tramos cortos de aminoácidos que tienen alta homología de secuencia y similitud de estructura tridimensional. Actúan a valores de pH ácidos, poseen una preferencia de ruptura entre aminoácidos hidrófobos, son inhibidas por la pepstatina, presentan puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3,0 a 4,5 y sus masas moleculares están dentro del rango de 30 a 50 kDa.

La base de datos MEROPS, clasifican ocho subfamilias dentro de las proteasas aspárticas con la secuencia de los aminoácidos Asp-Thr (Ser)- Gly en su sitio activo. Las subfamilias difieren según la posición del mismo, los residuos específicos, el número de puentes disulfuro presentes dentro de la estructura y el pH óptimo en el que funciona la enzima.

La mayoría de las proteasas aspárticas se ajustan a estas características, existen diferencias sustanciales relacionadas a las propiedades catalíticas, la localización celular y las funciones biológicas. En general, se sintetizan como precursores inactivos, que se convierten a la forma activa por activación en medio ácida, sufren proteólisis autocatalítica y participan en la eliminación de cadenas de polipéptidos del extremo donde está ubicado el nitrógeno terminal (N-terminal).

El mecanismo de acción más ampliamente aceptado de las proteasas aspárticas, es una catálisis ácido-base, que se puede denominar "empujar-tirar", que implica dos residuos activos de ácido aspártico en el sitio activo, que actúan como donador y aceptor de protones, así como, una molécula de agua que reside entre ellos y que realiza un ataque nucleofílico carbono carbonílico específico en el sustrato. (Vigueras et al; 2019).

El *Mucor*, es un hongo que se desarrolla normalmente

como saprofítico en el suelo, materia orgánica, estiércol de herbívoros, en general se consideran como un fitopatógeno de menor importancia. *Mucor miehei*, *M. pusillus* y *M. bacilliformis* han sido muy utilizados para la producción de proteasas y su aplicación en la industria alimentaria y bebidas fermentadas y en la coagulación de la leche en la fabricación de queso. Estas especies generalmente se han demandado en preferencia como un sustituto del cuajo de rumiantes por su especificidad en la hidrólisis de los péptidos de los kappa-caseína, por su alta proporción en la coagulación de la leche durante la actividad proteolítica y sus requerimientos de calcio muy similar al uso tradicional y por la obtención de un queso de buena calidad. En un trabajo de investigación se pudo evidenciar que el crecimiento celular del hongo *Mucor* aumentó rápidamente en las primeras etapas. La síntesis de enzimas comenzó en las primeras 24 h. cuando el consumo de nutrientes era alto. Hubo reducción en la actividad enzimática después de alcanzar un máximo de 120 h. (Alves et al; 2005). Desde esta orientación vendría a ser una alternativa a la utilización de la enzima quimosina extraída de rumiantes (Solera, et al; 2010).

Al igual que el *Mucor*, hay la existencia de otros hongos que han sido de interés industrial como es el caso de *Aspergillus* spp., *Cándida*, *Neurospora* y *Rhizopus*, han sido amplia-



mente explotadas en diversas industrias, lo que refleja la actividad de estas enzimas a diferentes valores pH y temperaturas. Las proteasas ácidas se han obtenido en las especies *Mucor miehei*, *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus* y *Mucor bacilliformis*. De igual manera se han logrado obtener proteasas ácidas parecidas a la pepsina a partir de especies de *Aspergillus* y *Rhizopus*. (Sethi et al; 2016).

Las proteasas aspárticas están codificadas por la comisión de enzimas como EC 3.4.23, conocidas como proteasas ácidas, son una subfamilia de endopeptidasas que se han aislado de diversas fuentes, incluidos virus, bacterias, hongos, plantas y animales. Enzimas del tipo renina se han aislado a partir de la *Endothia* parasítica (endotiapepsina, EC 3.4.23.22), y de las especies de *Mucor* y *Rhizomucor* (mucorpepsina, EC 3.4.23.23). Estas enzimas tienen pesos moleculares en un rango de 30 a 45 kDa y contienen uno o dos residuos de ácido aspártico conservados en el sitio activo. Estas proteasas aspárticas presentan pH óptimo ácido entre el rango de pH 3,0 y 5,0 y son inhibidas por la presencia de Pepstatina A.

Las proteasas y su aplicación en la industria alimentaria

Las proteasas tienen una gran diversidad de aplicaciones

en el procesamiento de alimentos, por ejemplo, en el procesamiento de lácteos, panadería, pescados y mariscos, procesamiento de proteínas animales, ablandamiento de carne, procesamiento de proteínas vegetales y generación de péptidos bioactivos. El objetivo principal de la aplicación de enzimas en el procesamiento de alimentos es mejorar las propiedades nutricionales y funcionales de los alimentos, como la digestibilidad, las modificaciones de la calidad sensorial, la mejora de la capacidad antioxidante y la reducción de compuestos alergénicos (Tavano, 2013). Sin embargo, la elección de la enzima y el grado deseado de hidrólisis deben realizarse teniendo en cuenta el sabor, la solubilidad y las propiedades de aplicación específicas del producto hidrolizado.

Los hidrolizados de proteínas pueden usarse para la regulación de la presión arterial, para formulaciones de alimentos infantiles, para productos dietéticos terapéuticos específicos y para el enriquecimiento de jugos de frutas y refrescos (Ray, 2012 citado por Singh and Bajaj, 2017). Sin embargo, el sabor amargo de los hidrolizados de proteínas es una barrera importante en su amplio rango de utilización. La intensidad del amargor es proporcional a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en los hidrolizados, el uso de exopeptidasas como la aminopeptidasa que tiene la particulari-

dad de romper y liberar estos aminoácidos hidrofóbicos como la leucina y prolina, solventaría esta dificultad mejorando el sabor en productos amargos (Sumantha et al; 2006).

Fermentación sumergida

En los procesos de crecimiento de microorganismos se hace uso de la fermentación, dentro de la cuales hay varias clasificaciones, según el medio de cultivo que se esté utilizando para el crecimiento del microorganismo llámese hongo o bacteria están la fermentación sumergida en medio líquido y la fermentación en estado sólido, las cuales tiene influencia en el crecimiento del microorganismo y también en la producción de enzimas, la principal diferencia entre ellos está la cantidad de agua que utilizan. En estado líquido los microorganismos crecen con alta disponibilidad de agua y en estado sólido los microorganismos crecen en forma natural en material de soporte de sólidos inertes en presencia de un contenido de agua libre muy bajo moviéndose dentro de un rango entre 12 y hasta 70 % de agua. De allí deriva que la fermentación sumergida es la más adecuada para bacterias y la sólida para hongo por el tipo de crecimiento estructural, filamentosos, de agregado.

Marathe et al, (2018) En investigación desarrollada con *Bacillus subtilis* en fermentación sumergida lograron una



mayor actividad enzimática cuando las condiciones se mantenían a pH 10,0; temperatura de incubación entre 55°C a 60°C, cuando el sustrato utilizado era caseína y cuando los medios de producción fueron optimizados con glucosa, extracto de levadura y nitrógeno como fuente de carbono. Entre los bacilos que se han identificado en investigaciones como fuentes principales de proteasas alcalinas están *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus licheniformis*.

Trabajo desarrollado por Asker et al, (2013) en sobrenadante obtenido a partir del cultivo del *Bacillus megaterium* lograron obtener una proteasa que alcanzó una actividad específica de 41,09 U mg⁻¹, la enzima fue purificada mediante precipitación con sulfato de amonio al 60 % y logrando un 73,45% del rendimiento de la enzima con un nivel de purificación de 6,09 veces con respecto al extracto crudo.

La industria de las enzimas utilizan cultivo de microorganismos y medio sintéticos y el costo de los medios de cultivo representan un rango entre el 60 y 80 % del costo total de producción de la enzima. Por lo tanto en la actualidad el enfoque de los trabajos de investigación está dirigido al uso de material orgánico de desecho como medio de crecimiento

para diferentes microorganismos con el fin de reducir los costos de producción. Estudios previos utilizando desecho orgánico como fuente de carbono y de nitrógeno en procesos de fermentación de aislado de bacterias para la producción de proteasas a nivel de fiolas han alcanzado resultados positivos en aumento pronunciado en la actividad específica después de las etapas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Como resultado de esta purificación se obtuvo una enzima con una actividad específica de 300 U / mg de proteína con un nivel superior en 17,04 veces la actividad enzimática con respecto al extracto crudo y un porcentaje de recuperación del 34,6%. El peso molecular de la proteasa purificada se determinó usando SDS-PAGE en condiciones no reductoras (71 kDa) y reductoras (35 kDa y 22 kDa). (Iqbal et al; 2018).

Lo importante de este enfoque está orientado en la necesidad de disminuir costos, y los mismos son tan elevado en el uso de la materia prima lo cual lo direcciona hacia una necesidad obligada a disminuir de manera significativa a través del uso del material orgánico, más económico existente al cual se le pueda dar uso de la manera más fácil, más accesible y más abundante y todo esto apunta desde el pasado al interés que siempre se ha mostrado en las fuentes residua-

les orgánicas generadas por la agroindustria con lo cual se contribuiría a disminuir el impacto ecológico que la mismas han representado en el tiempo.

Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido, es un sistema heterogéneo donde están involucradas las fases sólidas, líquida y gaseosa. Este sistema, se ha utilizado para la producción de diversos metabolitos de interés comercial tales como antibióticos, enzimas, alcohol, metano y ácido cítrico. Es importante elegir un sustrato adecuado para una eficiente fermentación, el cual puede suplementarse con nutrientes como glucosa, nitrógeno, sales minerales, entre otros en función de que el microorganismo tenga requerimientos nutricionales y elementos inductores para su crecimiento y producción de metabolitos de interés.

En los medios de crecimiento para microorganismo en estado sólido, la cantidad de agua utilizada van desde un nivel de 12 % hasta niveles de 70 % de humedad, valores por debajo minimizan la actividad biológica y hace dificultosos el crecimiento de microorganismos, bajo estas condiciones de humedad, los microorganismos que se ven favorecidos son los hongos, debido a la capacidad que tienen crecer en medios con baja actividad de agua.



Un aspecto importante a considerar en los procesos de fermentación son los costos asociados en la producción de proteasas. A nivel industrial se tiene en perspectiva la fermentación en estado sólido, en comparación con la fermentación sumergida, la fermentación sólida permite el empleo de sustratos complejos de origen agrícola que son abundante, prácticos y económicos con lo cual se logra una considerable reducción de costo. Los hongos filamentosos son los más adecuados para la fermentación en estado sólido, el crecimiento se visualiza en modo de hifas, hay tolerancia a la baja actividad de agua del medio, a la alta presión osmótica y es competitiva por la micro flora natural en la bioconversión de sustratos sólidos hay hongos que segregan múltiples enzimas, lo cual contribuye a generar productos que quedan a la disposición para que el propio microorganismos los metabolice.

La fermentación sumergida se aplica fundamentalmente en el crecimiento de bacterias, es más adecuada, su crecimiento no genera agregado, con lo cual quedan libre en solución sin crear problemas de transferencia de sólidos en solución, en este método es común la aplicación de la esterilización térmica, para garantizar la inocuidad del medio de cultivo. Una desventaja de la fermentación sumergida es la presencia o la generación de metabolitos que pueden inhibir el crecimiento y

metabolismo celular por parte de las bacterias, de allí la que la selección de los medios de cultivo tienden a ser muy selectivos en función de minimizar este tipo de factores a los que se ven sometidos en este tipo de cultivo.

En los procesos fermentativos para la producción de proteasas, se tiene que para el caso de bacterias un tiempo de duración que entre dos y cuatro días y en el caso de hongos los tiempos son mayores van desde un mínimo de tres, hasta cuatro y siete días que se han reportado investigaciones. Las concentraciones de enzimas que se pueden obtener alcanzan valores de 30 g / L, que luego son separadas del medio de fermentación aplicando métodos de centrifugación, en el caso de bacterias o combinada con filtración en el caso de hongos. La secreción de enzimas extracelulares no está directamente relacionado con el crecimiento microbiano, y su generación se puede inducir por las variaciones en las condiciones del medio ambiente de fermentación a bajo niveles de nutrientes y con una mayor proporción en la relación entre carbono / nitrógeno (Gonçalves y Sato; 2017).

Estudio desarrollado con una cepa aislada de la *Neurospora crassa* CGMCC3088, en la producción de proteasas utilizando la pulpa de soya conocida como okara, como medio de fermentación en estado sólido,

se alcanzaron las siguientes condiciones óptimas: okara, 10 g; agua, 21 ml; pH inicial, 5,0; temperatura de incubación 30°C; cantidad de inoculación, 2 ml; tiempo de fermentación, 72 h, con una actividad de proteasa correspondiente de 1.959,82 U / g. (Zheng, 2020).

Por otro lado Sethi et al; (2016) en trabajo desarrollado con suplementación de diferentes fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en medio de fermentación en estado sólido, utilizando para ello el hongo *Aspergillus terreus* se obtuvo que la suplementación con peptona, fue la que mejor favoreció la producción de proteasa entre todas las otras fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas utilizadas en el estudio. La producción de proteasa se inició a las 24 h y aumentó durante un máximo de 96 h. La biomasa aumentó sustancialmente después de 24 h y continuó hasta 144 h, con una producción máxima de enzimas a las 96 h que posteriormente permaneció estable antes de mostrar una disminución en el perfil de crecimiento.

La proteasa endopeptidasas del tipo *aspergillus pepsi* A, derivada del hongos *Aspergillus niger*, cultivada por fermentación en estado sólido fue purificada haciendo uso de técnicas cromatográficas convencionales. Se encontró una masa molecular de $50 \pm 0,5$ kDa. El pH y la temperatura óptimos fueron de 3,5 y 60 °C



respectivamente. La enzima fue estable durante 60 minutos a 50 °C. La actividad específica fue de 40.000 ± 1.800 U / mg. La enzima tenía una homología del 85% con la endopeptidasa aspártica tipo aspergillus pepsina A, reportada para el *Aspergillus niger* CBS 513.88. La *Pepstatina A*, mostró inhibición reversible con un valor de constante de inhibición K_i de $0,045 \mu\text{M}$. Se encontró un grado de hidrólisis de sustratos comerciales en el siguiente orden de mayor a menor: la hemoglobina fue mayor a la soja desgrasada, y esta mayor al gluten y este mayor a la gelatina y este mayor a leche descremada. Las propiedades funcionales de la soja desgrasada hidrolizada fueron mejoradas. Esta proteasa aspártica es un excelente potencial para la manipulación genética biotecnológica para las industrias de alimentos y piensos. (Purushothaman et al; 2019).

Fabricación de queso

La fabricación de queso es un procedimiento complejo, que involucra muchos pasos y transformaciones bioquímicas. Dependiendo del origen de la leche o del proceso de coagulación aplicado, se puede obtener una amplia gama de colores, texturas, sabores, niveles de firmeza y aromas. Existen más de 2.000 variedades de queso en el mundo. Algunas estadísticas han demostrado que el mercado mundial del queso representaba aproxi-

madamente 90 mil millones de dólares para el año 2016, y se estima que alcanzará más de 100 mil millones para 2022 (<https://www.statista.com/>). Por todas estas razones, la investigación de nuevas enzimas capaces de producir quesos con características, aromas y sabores novedosos sigue siendo un tema muy relevante, que merece mantenerse en estudio (Silva, et al; 2020).

Se tiene que la coagulación de la leche es la fase principal en la producción del queso. Este fenómeno se logra mediante el uso de enzimas coagulantes, como las proteasas de origen animal, microbiano y vegetal. La enzima quimosina (EC 3.4.23.4), extraída de los estómagos de rumiantes, es la proteasa más utilizada para la fabricación de queso. La creciente demanda de quimosina combinada con la poca disponibilidad de esta, así como existencia de aspectos religiosos (Islam y judaísmo) y dietéticos (vegetarianismo) son algunos factores que han estimulado los estudios para encontrar fuentes alternas para la coagulación de la leche. Muchas de estas enzimas no reúnen los requisitos a nivel de rendimiento y los tiempo de procesamiento, así como en sabor del mismo (Silva et al; 2020).

Las caseínas (α_1 -, α_2 , β - y κ -caseínas) son las proteínas lácteas más abundantes en la leche y forman estructuras coloidales bien ordenadas, deno-

minadas micelas (Silva, et al; 2020). Cualquier evento que desestabilice la estructura de la micela provocará la coagulación de la leche. Por ejemplo, las proteasas coagulan la leche porque la hidrólisis de κ -caseína reduce la repulsión estérica y electrostática entre micelas, promoviendo su agregación. Sin embargo, la hidrólisis extensa o inespecífica de caseínas puede producir quesos con características indeseables. Por lo tanto, es muy importante determinar la especificidad de la proteasa hacia la κ -caseína (Silva et al; 2020).

El cuajo está constituido por dos proteasas (quimosina y pepsina), tienen una doble función en la fabricación de queso. La quimosina es el componente principal y su papel es la hidrólisis específica del enlace Phe105-Met 106 de la proteína κ -caseína. La Permanencia de la enzima también contribuye a la proteólisis que ocurre durante maduración de queso. La mayor parte de la actividad coagulante se pierde con el suero, pero queda un residual enzimático en la cuajada que sigue desarrollando reacciones hidrolíticas. Aunque la quimosina es el componente principal debido a su especificidad, existe otra proteasa presente denominada pepsina, la cual se mantiene durante el proceso de maduración llevando acciones proteolíticas, rompiendo enlaces peptídicos de aminoácidos aromáticos que contribuyen a generar cambios

aromáticos y en el sabor de los quesos madurados.

Durante la proteólisis se hacen presentes modificaciones de productos bioquímicos en la producción de queso, lo que conlleva a importantes transformaciones en el sabor y textura, los cuales pueden ser alterados de manera significativa, según la relación de hidrólisis durante el proceso de maduración. Pequeños péptidos generados por proteólisis puede ser más soluble y de mejor sabor que la caseína intacta o incluso proteínas de suero. La liberación de aminoácidos, que puede actuar como precursores de reacciones catabólicas, se cree que es el responsable del desarrollo del sabor del queso.

La creciente demanda de la industria del queso y la creciente escasez de cuajo provenientes de rumiantes ha enfocado el interés en la búsqueda de fuentes alterna de enzimas que coagulen la leche. Las utilizations de enzimas de origen microbianas se ven favorecidas especialmente porque pueden ser producidas de forma masiva y bajo condiciones controladas y planificadas y ofrece una variedad de propiedades que permiten la selección de las condiciones y variables más adecuadas para la utilización en la fabricación de queso.

Hsiao, et al (2014). Hacen mención que la enzima adecuada para la coagulación de la

leche debe tener una alta especificidad de actividad caseinolítica; sin embargo, muchos niveles de actividad reportados son bajos, en su desarrollo de investigación encontraron que el peso molecular de la enzima purificada a partir del *Rhizopus orizae* determinado por SDS-PAGE, obteniendo un valor aproximado de 39 kDa. La enzima purificada parece ser una proteasa aspártica, la misma fue inhibida en presencia de Pepstatina A. El pH óptimo fue de 3,4 y estable a 35 °C, apropiado para aplicaciones y procesamiento de alimentos.

Otra vía de aplicación alterna del uso de la proteasa, se puede reflejar en investigación desarrollada de la hidrólisis de la caseína en leche con enzima extraída del hongo *Mucor miehei*, la cual fue inmovilizada para evitar la coagulación de la leche, la hidrólisis se realizó a 4 °C, evitando la precipitación de caseína, y luego la leche hidrolizada fue filtrada y calentada a 30 °C, logrando un agregado similar al cuajo soluble. Para muchos quesos, la proteólisis no se limita a la acción de enzimas añadidas, sino también a las enzimas secretadas por microorganismos presentes, lo cual contribuye con reacciones adicionales que dan lugar a otros fenómenos que influyen en las características organolépticas de la misma. (Tavano; 2013).

Las proteasas microbianas producidas por *Rhizomucor*

miehei, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria* parasítica, ya están disponibles en el mercado. Sin embargo, es difícil encontrar una alternativa apropiada para la quimosina. Por ejemplo, a pesar de su alta actividad de coagulación de la leche, la quimosina muestra una actividad proteolítica débil en comparación con muchas otras proteasas. Una alta relación de coagulación de la leche con respecto a la actividad proteolítica se considera un parámetro crítico para la inserción de proteasas como sustitutos de la quimosina (Alavi y Momen, 2020).

Es tanto el interés existentes en buscar vías alternas en la producción de queso, que se ve reflejado en una publicación de este año 2020, la cual está enfocada en la producción de una enzima proteolítica pero en este caso no es microbiana, es a partir de alga, la cual mostró una actividad caseinolítica óptima a 60 °C y un rango de pH entre 6-8. Mostrando una alta proporción de coagulación de la leche. Se confirmaron dos tipos de proteasas, una serina proteasa y una metalo proteasa, con un peso molecular de 44 y 108 kDa; respectivamente. Exhibieron una alta actividad hidrolítica en la κ -caseínas, rompiéndola en cuatro sitios principales, uno de los cuales es el mismo que el cuajo de rumiante, este resulta ser el primer caso reportado para una proteasa extraída de algas (Arbita et al; 2020). Todo esto



lleva a pensar en las consideraciones económicas, que hay que tener en cuenta lo que todo esto significa en tener que hacer uso de la tecnología para procesar las algas, la disponibilidad de cultivo suficiente, así como los rendimientos que puedan generar su producción, estos son aspectos importante a la hora de evaluar la factibilidad económica de esta vía alterna de producción de cuajo para la industria quesera.

Ingeniería genética como perspectiva futura

La ingeniería genética puede ser aprovechada en muchos aspectos por la contribución importante y significativa para la vida, para la protección del medio ambiente, para la salud humana, para la producción de alimentos, para la cría de animales, para la fabricación de bioinsumos y combustibles energéticos. En el futuro, la manipulación de la composición genética de diferentes microorganismos facilitará la producción de proteasas bajo las mejores condiciones con características específicas, para acciones específicas en función a un objetivo específico e industrialmente importante para satisfacer los requisitos humanos deseados.

El estudio de los aspectos bioquímicos y moleculares de los sistemas proteolíticos de las proteasas, ha venido ganando interés de manera progresiva por los investigadores enfocado en: búsqueda de en-

zimas bacterianas resistentes por el alto valor comercial que significan. La bioinformática, en conjunto con la proteómica y la omica jugaran un papel valiosísimo en la producción de proteasas con nuevas propiedades. Se están adoptando estrategias avanzadas para generar cepas mejoradas productoras de proteasas. Se producirán cepas microbianas con características deseables mediante el uso de cambios evolutivos *in vitro* en la estructura primaria de la proteína. Uno de los principales objetivos de los científicos es lograr proteasas con características para un mayor rendimiento, uso de sustratos más específicos y convenientemente más económicos, con mejor estabilidad térmica, con una amplitud pH óptimo y la prevención de la inactivación auto proteolítica, el control de la proteólisis prolongada, la minimización de efectos inhibitorios.

Hoy en día, los investigadores han incorporado nuevos elementos y herramientas para mejorar el rendimiento de la proteasa para uso industrial, como es la clonación y la sobreexpresión, la selección de cepas, fermentación por lote alimentado, fermentación en flujo continuo. También se han utilizado herramientas estadísticas, como la metodología de superficie de respuesta para lograr la optimización de diferentes medios y condiciones de crecimiento.

Hay que tener presente que la industria de alimentos y bebidas, por la inmensidad de consumo que representa para la población, contribuye mucho al crecimiento del producto interno bruto dentro de las naciones, para lograr el aumento en el desarrollo de productos del sector alimentario, los investigadores deberían centrarse en la producción de altos rendimientos de enzimas a partir de microorganismos a través de la manipulación de genes y también en la síntesis de productos de bajo costo y alto valor a través de sistemas económicos de procesamiento, que a su vez podrían ser accesibles y asequibles para todas las personas. Se tiene que los Estados Unidos es el principal consumidor de enzimas, China es el mayor proveedor de enzimas, seguido por Japón. Ciertas encuestas indican que Europa occidental sería el mayor productor de enzimas en un período de 10 años. (Gurumallesh et al; 2019).

Los procesos, como la síntesis y secuenciación de péptidos, la digestión de proteínas no deseadas, la digestión proteolítica de proteínas, la aplicación de la tecnología de ADN recombinante y la ingeniería se pueden utilizar para mejorar la producción de enzimas industriales específicas de alta prioridad y el uso de microorganismos extremófilos podrían ser explotados para la producción de más adecuadas y para ello se requiere de un inmenso impulso de investigación.

Conclusiones

Hoy en día las investigaciones más importantes están centradas en trabajar con bacterias y hongos cada una dentro de las ventajas que representan, bajo su control, regulación y monitoreo, modificaciones en espacios reducidos y en tiempos cortos y bajo condiciones controladas lo que ha permitido hasta ahora generar un conocimiento inmensurable de importancia para la humanidad.

Las proteasas tienen un gran campo de aplicación industrial como la farmacéutica, alimentos, cuero, textil, y detergentes y su tendencia es al aumento progresivo en tal magnitud que se pierde en el horizonte.

En el campo de aplicación de la industria de los alimentos, los procesos biotecnológicos diseñados para obtener hidrolizados con péptidos específicos, el uso de la proteólisis en la modificación de las propiedades de las proteínas, como la solubilidad, gelificación, emulsificación y capacidad espumante, reducción de alergia a proteínas, transformación de sabor o liberación de péptidos bioactivos.

Las investigaciones están orientadas a producir altos niveles de proteasas a bajo costo haciendo uso de medios de cultivo económicos, el uso de la herramientas de la bioinformática, la proteómica y la omica,

manipulación genética a través del ADN recombinante, con el objetivo de obtener enzimas más adecuadas, más específicas en su acción y bajo las mejores condiciones controladas de producción que se puedan explotar a nivel industrial.

A pesar de los avances alcanzados y las modificaciones introducidas y las mejoras logradas aún no se ha obtenido una proteasa en cantidad y calidad que sea única en la aplicación para la elaboración de queso. Las proteasas más adecuadas son las ácidas, las mismas son segregadas por hongos, los mismos son difíciles para cultivarse, sus tiempos de producción son largos, los métodos de purificación aún siguen siendo múltiples, engorrosos y costosos, los sustratos para el cultivo microorganismos aún siguen siendo un elemento de investigación por la complejidad que los mismos representan para el logro de objetivos muy específico.

El avance en los sistemas bioinformática y el uso de las herramientas omica y proteómicos y con la aplicación de la tecnología del ADN recombinante, es la vía más expedita, para que los bioinvestigadores avancen significativamente y puedan lograr en periodos cortos, soluciones a estas problemáticas, no solo para un área en específica si no para todo el amplio campo donde se mueve, en beneficio de la humanidad y en el planeta.

Referencias

- ALAVI, F. y MOMEN, S. (2020). *Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry*. International Dairy Journal Volume 107.
- ALVES, M. H., CAMPOS-TAKAKI G. M., OKADA K., FERREIRA, I. and MILANEZ I. (2005). *Detection of extracellular protease in *Mucor* species*. Rev Iberoam Micol; 22: 114-117.
- ARBITA, A., NICHOLAS, A. PAUL, J., JIAN Z., (2020). *Extracción, purificación parcial y caracterización de proteasas de algas rojas *Gracilaria edulis* con sitios de escisión similares en κ -caseína como cuajo de ternera*. Química de Alimentos, Volumen 330.
- ASKER M.S., MAHMOUD G., SHEBWY EI, ABD EL AZIZ S. (2013). *Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium**. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 11, 103-109.
- BEG, K., GUPTA R. (2003). *Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis**. Enzyme and Microbial Technology 32, 294-304.



- COPETTI, V. (2019). *Fungi as industrial producers of food ingredients*. Current Opinion in Food Science, 25:52-5.
- GONÇALVES DOS SANTOS, J.; HARUMI, H. (2017). *Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates*. Food Research International.
- GUO, Tu Tao, PENG Y., YARU W., YAXIN R., BIN Y., HUIYING L. (2019). *High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from Talaromyces leycettanus JCM12802 and its potential application in juice clarification*. Food Chemistry Volume 281, Pages 197-203.
- GURUMALLESH P., KAMALINI A., BASKAR R., SHANMUGAPRAKASH M. (2019). *A systematic reconsideration on proteases*. Review International Journal of Biological Macromolecules 128; 254-267. Recuperado en: [Http://merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk).
- HSIAO N.W. ; CHEN Y.; KUAN Y.S.; LEE Y.; LEE S. K.; CHAN, H. H.; KAO C.H. (2014). *Purification and characterization of an aspartic protease from the Rhizopus oryzae protease extract, Peptidase R*. Electronic Journal of Biotechnology 17 89-94.
- IQBAL ASIF, HAKIM AL, MD., SADDAM HOSSAIN MOHAMMAD REJAUR RAHMAN, ISLAM KAMRUL, MD. JAHED AHMED FAISAL AZIM, ASSADUZZAMAN MD., MD. HOQ MOZAMMEL AND KALAM AZAD ABUL. (2018). *Partial purification and characterization of serine protease produced through fermentation of organic municipal solid wastes by Serratia marcescens A3 and Pseudomonas putida A2*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 16, 29-37.
- KUMAR and TAKAG. (2000). *Proteasas alcalinas microbianas: desde un punto de vista bioindustrial*. Biotechnology Advances 17 (7): 561-94.
- LAKOWITZ A.; GODARD T., BIEDENDIECK R. KRULL R. (2018). *Mini review: Recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different Bacillus strains and future perspectives*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 126, Pages 27-39.
- LI SHUANG ; XIAOFENG YANG ; SHUAI YANG ; MUZI ZHU; XIAONING WANG (2012). *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering*. Computational and Structural Biotechnology. Journal Volume 2, Issue 3.
- LI SHUANG ; XIAOFENG YANG ; SHUAI YANG ; MUZI ZHU; XIAONING WANG (2012). *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering*. Computational and Structural Biotechnology. Journal Volume 2, Issue 3.
- MARATHE, S. K.; ARUN V. M ; P R A S H A N T H A.; PARVEEN N.; CHAKRABORTY, S.; NAIR S.S. (2018). *Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by Bacillus subtilis, Alcaligenes faecalis and Pseudomonas aeruginosa obtained from seawater samples*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 16, 39-46.
- PREZZI, L.; DEODATO DE SOUZA M.; SILVA M.; FIGUEIREDO, T.; ROLDAN, R.; SALAS, L.; SILVA DE OLIVEIRA A.; BENEDETA, R., GUEDES P.; VIANA PONTUAL E. and NAPOLEÃO, H. (2018). *Purification and characterization of a protease from the visceral mass of Mytella charruana and its evaluation to obtain antimicrobial peptides*. Food Chemistry 245; 1169-1175.

- PUENTE, X.; SÁNCHEZ, L.; OVERALL, C. (2003). *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. *Nat Rev Genet* 4, 544–558. <https://doi.org/10.1038/nrg1111>.
- PURUSHOTHAMAN, K.; SAGAR KRISHNA B.; GOPAL, M.; APPU RAO, G. (2019). *Aspartic protease from Aspergillus niger: Molecular characterization and interaction with pepstatin*. *A International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 139, Pages 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.133>.
- RAMÍREZ, J. y ACEVES M. (2014). *Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?*, Vol. 15; Núm. 12; ISSN 1607–6079. Recuperado en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- RAWLINGS, D. ; DOMINIC, P. T.; ALAN J. BARRETT; MEROPS: *la base de datos de peptidasa*. (2004). *Nucleic Acids Research*, Volumen 32, Issue suppl_1, páginas D160–D164. Recuperado en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh071>
- SATHISHKUMAR R.; GNANAKKAN A.; JEGANATHAN A. (2014). *Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated Bacillus subtilis GA CAS8 using agricultural wastes*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- SETHI BIJAY K.; ARIJIT J., NANDA PRATIVA K, DAS MOHAPATRA PRADEEP K, SAHOO SANTI L. (2016). *Thermostable acidic protease production in Aspergillus terreus NCFT 4269.10 using chickling vetch peels*. *Journal of Taiab University for Science* 10,571–583.
- SILVA MARIA Z, B. OLIVEIRA JOÃO P, RAMOS MÁRCIO V, DAVI F. FARIAS, CHAYENNE A. DE SÁ, JULIANA A.C. RIBEIRO, AYRLES F.B. SILVA, JEANLEX S. DE SOUSA, RAFAEL A. ZAMBELLI, ANA C. DA SILVA, GILVAN P. FURTADO, THALLES B. GRANGEIRO, MIRELE S. VASCONCELOS, SANDRO R. SILVEIRA, CLEVERSON D. T. FREITAS, (2020). *Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from Calotropis procera latex for cheese-making*. *Food Chemistry* Volume 307.
- SINGH, S.; BAJAJ, BK. (2017). *Espectro de aplicación potencial de proteasas microbianas para producción industrial limpia y ecológica*. *Energ. Ecol. Reinar.* 2, 370–386. Recuperado en: <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5>.
- SOLERA JIMÉNEZ, F., RODRÍGUEZ, A. y SOTO, B. (2010). *Evaluación de la producción de proteasas en dos cepas de Mucor sp. Por fermentación sumergida empleando dos tipos de medio de cultivo*. *Unicencia* 24 pp. 63-68
- SUMANTHA ALAGARSAMY; CHRISTIAN LARROCHE AND ASHOK PANDEY (2006). *Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective*. *Food Technol. Biotechnol.*; 44, (2) 211–220.
- TAVANO, O. L. (2013). *Review Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Volume 90, Pages 1-11. Recuperado en: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- TAVANO, O. L. (2013). *Review Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Volume 90, Pages 1-11. Recuperado en: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>



Tundo G. R.; D. SBARDELLA; A.M. SANTORO; A. COLETTA; F. ODDONE; G. GRASSO; D. MILARDI; P.M. LACAL; S. MARINI; R. PURRELLO; G. GRAZIANI; M. COLETTA (2020). *El proteasoma como objetivo farmacológico con múltiples potencialidades. En Adrio, JL; Demain, AL (2014). Enzimas microbianas: herramientas para procesos biotecnológicos. Biomoléculas, 4, 117-139.*

VIGUERAS, Y. S. ;TOVAR ,X.; RAMÍREZ, M. Del R. y MERCADO, Y. (2019). Capítulo I Enzimas proteolíticas: Generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas. DOI: 10.35429/H.2019.4.1.15.

ZHANG G.; WANG H.; ZHANG X. NG T. (2010). *Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom Helvella lacunosa. J. Biosci. Bioeng.109, 20 – 24 . 1 0 . 1 0 1 6 / j . jbiosc.2009.06.022.*

ZHENGLIUFENG, XINYING YU, CHANGHAO WEI, LEYUN QIU, CHENGWEI YU, QIAN XING, YAWEI FAN, ZEYUAN DENG. (2020). *Producción y caracterización de una nueva proteasa alcalina a partir de un recién aislado Neurospora crassa a través de la fermentación en estado sólido. LWT; Volumen 122*

