

## Capítulo I Enzimas proteolíticas: Generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas

### Chapter I Proteolytic enzymes: Generalities and the importance of the fungal aspartyl proteases

VIGUERAS-MORALES, Yajaira Sulim†\*, TOVAR-JIMÉNEZ, Xochitl, RAMÍREZ-VARGAS, María del Rocío y MERCADO-FLORES, Yuridia

*Universidad Politécnica de Pachuca*

ID 1<sup>er</sup> Autor: *Yajaira Sulim, Viguera-Morales* / **ORC ID:** 0000-0001-6710-5497, **CVU CONACYT ID:** 858288

ID 1<sup>er</sup> Coautor: *Xochitl, Tovar-Jiménez* / **ORC ID:** 0000-0002-6626-6237, **CVU CONACYT ID:** 228873

ID 2<sup>do</sup> Coautor: *María del Rocío, Ramírez-Vargas* / **ORC ID:** 0000-0003-3811-4137, **CVU CONACYT ID:** 266405

ID 3<sup>er</sup> Coautor: *Yuridia, Mercado-Flores* / **ORC ID:** 0000-0003-3278-2783, **CVU CONACYT ID:** 122168

**DOI:** 10.35429/H.2019.4.1.15

Y. Viguera, X. Tovar, M. Ramírez y Y. Mercado

yuridiamercado@upp.edu.mx

A. Marroquín, J. Olivares, P. Díaz, L. Cruz. (Dir.) La ciencia y las mujeres en Mexico. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Queretaro, 2019.

## Resumen

Las proteasas también conocidas como peptidasas, son capaces de hidrolizar enlaces peptídicos de otras proteínas. Se encuentran distribuidas ampliamente en animales, plantas, y microorganismos y tienen gran importancia comercial, debido a que ocupan el mayor porcentaje de ventas en el mercado mundial de enzimas. Sus aplicaciones son principalmente en las áreas médicas y farmacéuticas, así como en la industria alimentaria y de detergentes. Su clasificación involucra dos grupos: exoproteasas y endoproteasas, dentro de estas últimas se encuentran las proteasas ácidas, mejor conocidas como aspartil proteasas, las cuales son de gran interés, principalmente en la industria de los alimentos y las bebidas. Aquellas de origen fúngico presentan gran demanda debido a las características que poseen, lo que ha dado como consecuencia el desarrollo de distintos métodos para aumentar su producción. El objetivo de esta revisión bibliográfica, es dar a conocer las generalidades de las proteasas de origen fúngico, específicamente las de tipo aspartil, así como su importancia y aplicaciones biotecnológicas en la industria médica, farmacéutica, de las bebidas y principalmente en la alimenticia, además de hacer mención de los avances en los métodos para aumentar su producción.

## Enzimas, Proteasas, Aspartil proteasas

### Abstract

Proteases also known as peptidases, are capable of hydrolyzing peptide bonds of other proteins. These enzymes are widely distributed in animals, plants, and microorganisms and have great commercial importance, because they occupy the highest percentage of worldwide sales. Its applications range from medical and pharmaceutical, to the food and detergent industry. Proteases are classified into exoproteases and endoproteases, among the latter are acidic proteases better known as aspartyl proteases, which are of great industrial interest, mainly in the food and beverage industry. Aspartyl proteases of fungal origin are the most used due to the characteristics they possess, because of this, they have a great demand in the global enzyme market, so different methods have been developed to increase its production. The objective of this literature review is to publicize the generalities of proteases of fungal origin specifically of the aspartyl type, as well as its importance and biotechnological applications in medical, pharmaceutical, the beverage, industry, and mainly in the food industry. In addition, mention the progress made in recent years of the methods reported so far to obtain the production of these proteases.

## Enzymes, Proteins, Aspartyl proteases

### 1. Introducción

Las enzimas proteolíticas, también conocidas como proteasas o peptidasas, son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, dando como resultado la producción de péptidos o aminoácidos libres. Muchas de ellas son importantes en la modificación y procesamiento post-traduccionales, debido a que poseen alta especificidad por su sustrato, dando lugar a la escisión selectiva de proteínas (Gupta *et al.*, 2002; Sabotic y Kos, 2012; Kamal *et al.*, 2017).

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en animales, plantas, microorganismos y hongos, en donde participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos, además de estar involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas, desde su biosíntesis, control de destino y activación, hasta su degradación, desempeñando funciones que incluyen la división celular, la transducción de señales, la esporulación, la digestión de las proteínas de los alimentos, la regulación de la presión arterial, la síntesis de proteínas virales, la apoptosis, el procesamiento de hormonas polipeptídicas, la degradación de proteínas plegadas incorrectamente, la autólisis, la protección contra péptidos dañinos y enzimas, entre muchas otras (Avilés *et al.*, 1994; Barrett *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005; Tyndall *et al.*, 2005).

Las proteasas son de gran interés industrial, por lo que, en el mercado mundial de enzimas, representan uno de los tres grupos más grandes y abarcan aproximadamente el 60% de la venta total (Banerjee y Raya, 2017). Tan solo en el año 2010, de los 3,300 millones de dólares que se generaron en este campo, las proteasas aportaron la mayor contribución (Mótyán *et al.*, 2013). Estas proteínas además de poseer gran importancia biológica, también se usan en varias aplicaciones que incluyen las industrias de alimentos, de bebidas, del cuero, farmacéuticas, médicas y de detergentes (Theron y Divol, 2014).

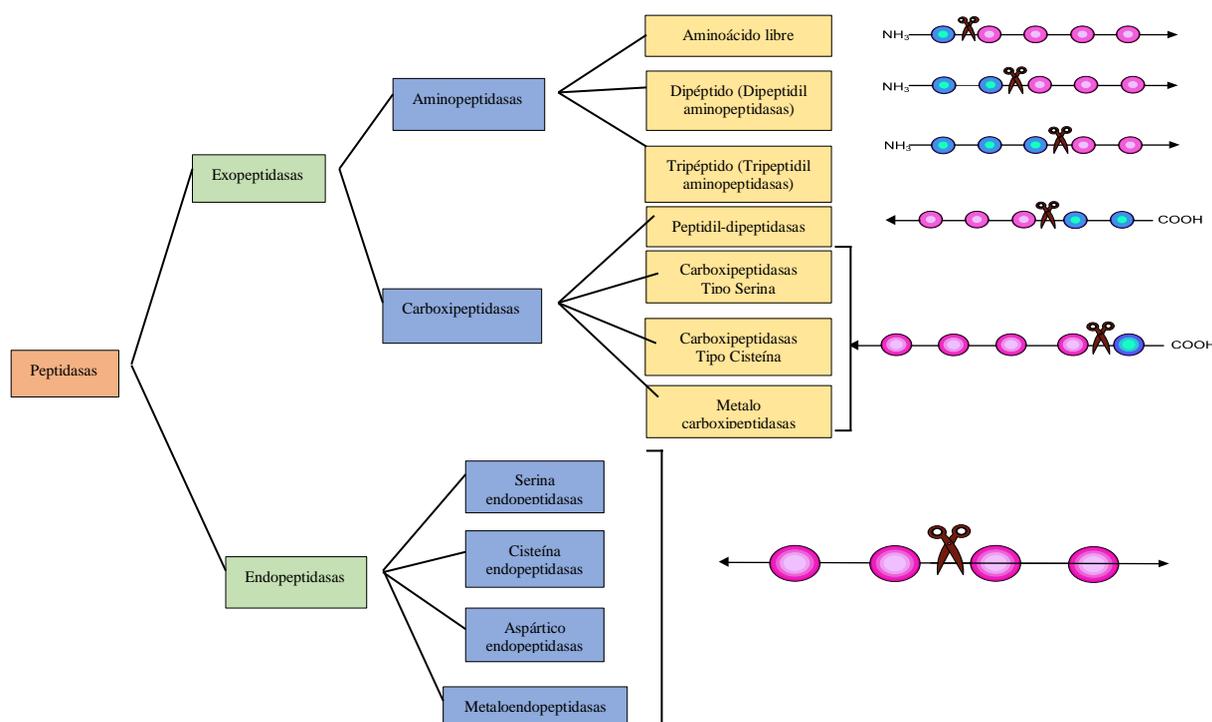
La gran diversidad de proteasas, en contraste con la especificidad de su acción, ha atraído la atención mundial en los intentos de explotar sus aplicaciones fisiológicas y biotecnológicas (Poldermans, 1990; Fox *et al.*, 1991).

## 2. Clasificación de las enzimas proteolíticas

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se ubican en el grupo 3, subgrupo 4 en donde se encuentran las hidrolasas (International Union of Biochemistry, 1992). Actualmente, se utilizan tres criterios principales, que son: sitio de acción, naturaleza química del sitio catalítico y el pH (Barrett, 1994). Teniendo como base su sitio de acción, las proteasas pueden ser exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.22-99) (Figura 1.1). Las primeras actúan cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas, lo cual les confiere la capacidad de romper el enlace peptídico de uno o unos cuantos aminoácidos. Las enzimas que hacen esta actividad en el extremo amino son llamadas aminopeptidasas (Figura 1.2) y pueden liberar aminoácidos simples (amino petidasas EC 3.4.11), dipéptidos (dipeptidil amino peptidasas, EC 3.4.14) o tripéptidos (tripeptidil amino peptidasas EC 3.4.14) (Figura 1.1). Este tipo de enzimas eliminan la metionina N-terminal de las proteínas secretadas y de aquellas que pueden ser expresadas heterológamente. Las aminopeptidasas son producidas por una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongos (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013; Theron y Divon, 2014).

Las exopeptidasas que actúan en el extremo carboxilo se denominan carboxipeptidasas (Figura 1.1), las cuales liberan un único aminoácido (Figura 1.2) o un dipéptido (peptidil dipeptidasas E.C 3.4.13) en los extremos C-terminales de la cadena polipeptídica. Estas enzimas también se clasifican en tres grupos, serin-carboxipeptidasas, metalo-carboxipeptidasas y cisteín-carboxipeptidasas, basándose en la naturaleza de los residuos de aminoácidos en su sitio activo (Figura 1.1) (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013; Theron y Divon, 2014). Las endopeptidasas se caracterizan por llevar a cabo la hidrólisis en los enlaces peptídicos de las regiones internas de la cadena polipeptídica (Figuras 1.1 y 1.2). Estas enzimas son industrialmente más importantes que las exopeptidasas y se clasifican según la especificidad del sustrato, mecanismo catalítico, estructuras tridimensionales y por los residuos de aminoácidos presentes en su sitio activo (Sumantha *et al.*, 2006).

**Figura 1.1** Clasificación de las peptidasas

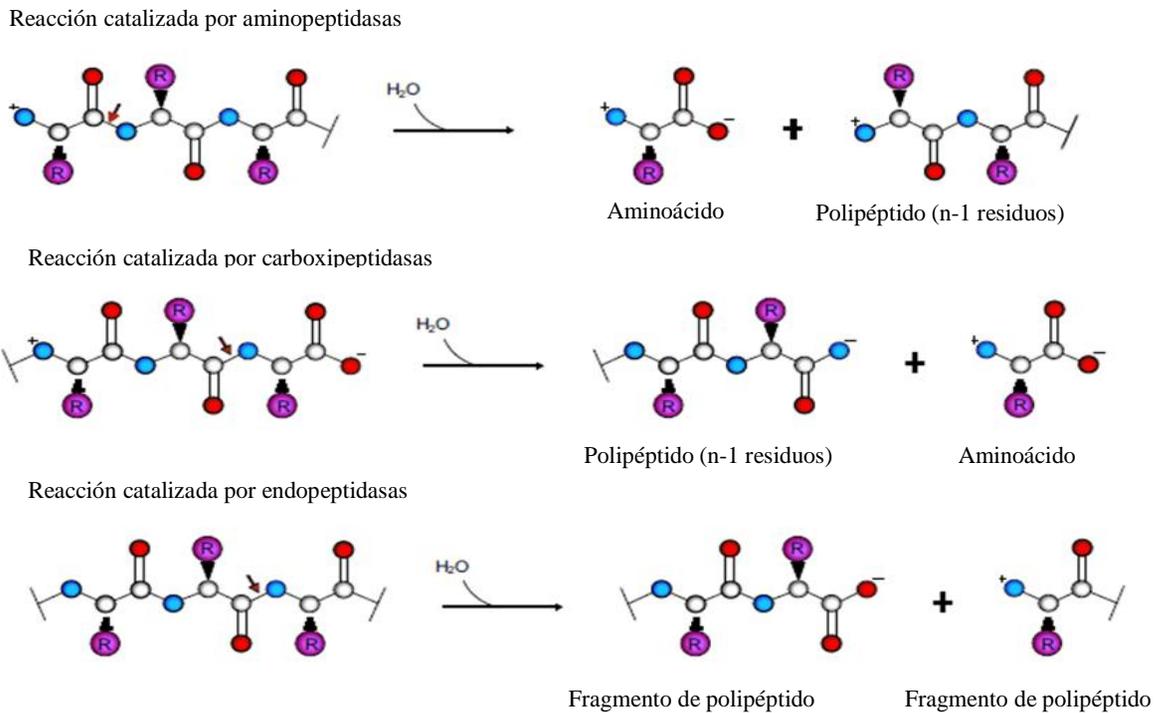


Fuente: Theron y Divon, 2014

Las tijeras indican el sitio donde la enzima realizará su acción. Los círculos de color azul representan los aminoácidos terminales. Los círculos de color rosa significan residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica.

Las endopeptidasas, a diferencia de las exopeptidasas, realizan la hidrólisis del enlace peptídico en el interior de la proteína (Figuras 1.1 y 1.2). Su clasificación se basa de acuerdo al tipo de aminoácidos que constituyen su sitio activo, así como a la presencia de metales en el mismo, por lo que se han descrito cuatro grupos: serín-proteasas, aspartil-proteasas, cisteín-proteasas y metalo-proteasas (Figura 1.1). Cada una de ellas con cierta especificidad para romper enlaces peptídicos (Tabla 1.1). (Rawlings y Barrett, 1993; Tyndall *et al.*, 2005).

**Figura 1.2** Acción de las aminopeptidasas y carboxipeptidasas eliminando los residuos de aminoácidos terminales, así como de las endopeptidasas sobre un sustrato polipéptido



Fuente: Mótyán *et al.*, 2013

Las flechas de color rojo muestran el sitio donde los enlaces peptídicos se escinden.

**Tabla 1.1** Principales características de las endoproteasas

Familia	Cofactores	Sitio activo característico	Intervalo de pH óptimo	Inhibidores	Fuente	Aplicaciones industriales
Serín-proteasas	Ca <sup>2+</sup>	Asp, Ser, His	7–11	PMSF EDTA Fenol Ácido triaminoacético	<i>Bacilo</i> <i>Aspergillus</i> Tejido animal (intestino)	Detergentes, médica y farmacéutica.
Metaloproteasas	Zn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	Glu, Try	7–9	Agentes quelantes como: EDTA EGTA	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	Alimenticia, médica y farmacéutica.
Proteasas de cisteína	ND	Cys, His, Asp	2–3	Indoacetamida p-CMB	<i>Aspergillus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Clostridium</i>	Alimenticia, médica y farmacéutica.
Proteasas aspárticas	Ca <sup>2+</sup>	Asp, Asp	2.5–7	Pepstatin EPNP DAN	<i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i> <i>Penicillium</i> , tejido animal (estómago)	Alimentos y bebidas

DAN: diazoacetyl- dl éster metílico norleucina, DON: 5-diazo-4-oxonorvaline, PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, p-CMB: ácido cloromercuribenzoico, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, EGTA: ácido etilen glicol, EPNP: 1,2-epoxi-3-(p nitrofenoxi) propano), ND: no determinado.

Fuente: Theron y Divol, 2014

En los últimos años se han generado intensivas investigaciones en el tema de las proteasas, lo que ha permitido ampliar el conocimiento sobre su estructura y el mecanismo por el cual actúan.

La disponibilidad de esta información en la base de datos de peptidasas MEROPS, ha conducido a mejoras en los esquemas de clasificación, además de constituir un sistema para el estudio integral de la diversidad de estas proteínas (Rawlings *et al.*, 2012). Con referencia a lo anterior, estas enzimas de diferentes clases pueden agruparse en familias tomando como base las similitudes estadísticamente significativas en su secuencia de aminoácidos. La nomenclatura que sigue este sistema es que cada familia se identifica mediante una letra que representa el dominio catalítico, las letras A, C, M, S, T, G, N y U se utilizan para el tipo aspártico, cisteína, metal, serina, treonina, glutámico, asparagina y desconocido respectivamente, seguido de un número característico. Las familias que se consideran homólogas y que han surgido de un único origen, se agrupan en un clan debido a que muestran evidencias sobre la relación evolutiva que tienen, y similitudes en sus estructuras terciarias, el orden de los residuos del sitio catalítico en la cadena polipeptídica y en los motivos de secuencias comunes alrededor del mismo (Barret *et al.*, 2001; Barret *et al.*, 2003; Rawlings *et al.*, 2012).

## 2.1 Serín proteasas

Las serín proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Se pueden encontrar en virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos. Generalmente son activas a pH neutro y alcalino, con un óptimo entre pH 7 y 11. Tienen amplias especificidades de sustrato incluyendo actividad esterolítica y amidasa. Sus masas moleculares oscilan entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoeléctricos se encuentran entre pH 4 y 6. Las proteasas alcalinas representan el mayor subgrupo de serín proteasas (Govind *et al.*, 1981; Barrett, 1994; Cera, 2009).

## 2.2 Cisteín proteasas

Las cisteín proteasas están presentes tanto en procariontas como en eucariotas. Su actividad depende de un par cisteína e histidina. Estas enzimas contienen una tríada de Cys-His-Asn en el sitio activo, se sintetizan como zimógenos y contienen un prodominio (regulador) y un dominio maduro (catalítico). El primero actúa como un inhibidor endógeno que debe ser eliminado para que la enzima madura pueda ser activada. En la mayoría de los casos, son activas sólo en presencia de agentes reductores tales como el cianuro de hidrógeno o la cisteína. Estas enzimas tienen pH óptimo neutro, aunque algunas de ellas, son más activas a pH ácido. La papaína es la proteasa de cisteína más conocida (Barrett, 1994; Verma *et al.*, 2016).

## 2.3 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son la clase de hidrolasas que escinden enlaces peptídicos por acción de una molécula de agua que se activa por iones metálicos bivalentes como el zinc, el cobalto, el manganeso o el níquel, la cual sirve como nucleófilo en la catálisis y también se coordina con el ion metálico como cuarto ligando (Wu y Chen, 2011). El ion metálico catalítico generalmente está coordinado por tres ligandos de cadena lateral de aminoácidos conservados, tales como: His, Asp, Glu o Lys y al menos otro residuo, que puede desempeñar un papel electrofílico (Fukasawa *et al.*, 2011).

Basándose en la especificidad de su acción, las metaloproteasas pueden dividirse en cuatro grupos: neutras, alcalinas, *Myxobacter* I, y *Myxobacter* II. Las primeras muestran especificidad para los aminoácidos hidrófobos, mientras que, para las segundas, esta misma propiedad no es restringida. *Myxobacter* proteasa I es específica para pequeños residuos de aminoácidos a cada lado del enlace de escisión, por otro lado, la proteasa *Myxobacter* II es específica para el residuo de lisina en el lado amino del enlace peptídico. Todas ellas son inhibidas por agentes quelantes tales como EDTA, pero no por agentes sulfhidrilos. Presentan diferentes propiedades, las cuales permiten explicar sus aplicaciones terapéuticas, patofisiológicas e industriales (Barrett, 1995).

## 3. Proteasas ácidas

Las proteasas de ácido aspártico (APs), comúnmente conocidas como aspartil proteasas o proteasas ácidas, son las endopeptidasas que dependen de dos residuos de ácido aspártico 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 bajos, poseen una preferencia de escisión entre aminoácidos hidrófobos, son inhibidas por la pepstatina, presentan puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3 a 4.5 y sus masas moleculares son de 30 a 50 kDa (Fitzgerald *et al.*, 1990; Blundell y Johnson, 1993; Barrett, 1995; Shah *et al.*, 2014).

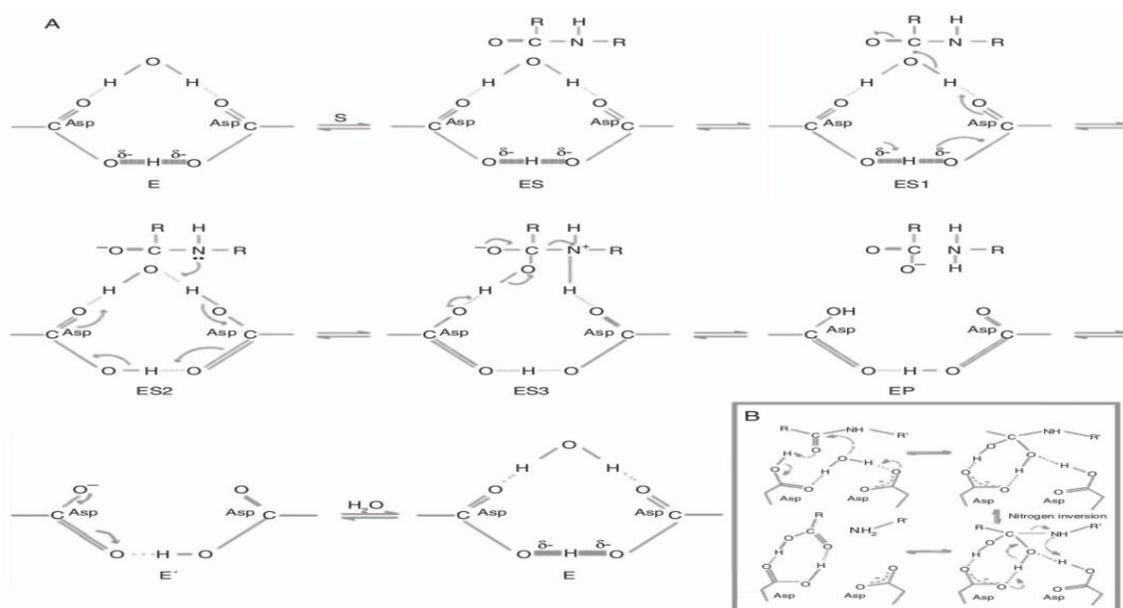
Si bien, la mayoría de aspartil proteasas se ajustan a estas características, existen diferencias sustanciales en términos de propiedades catalíticas, la localización celular y las funciones biológicas (Davies, 1990; Coates *et al.*, 2001). Las APs se pueden encontrar en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y virus, en donde desempeñan diferentes e importantes funciones (Horimoto *et al.*, 2009). En general, se sintetizan como precursores inactivos, que se convierten a la forma activa por activación ácida, proteólisis autocatalítica y la eliminación de cadenas de polipéptidos del extremo N-terminal (Santos *et al.*, 2013). En la enzima activa, los dos residuos de ácido aspártico están geoméricamente más cerca y un aspartato es ionizado. 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. El oxígeno de este último, a su vez, captura un protón de otro ácido aspártico en el sitio activo, dando como resultado un intermedio tetraédrico neutro no covalente, el cual es un estado de transición crucial, en el cual el amino del sustrato se convierte en un mejor grupo saliente (Figura 1.3) (Veerapandian *et al.*, 1992; Northtop, 2001; Dunn, 2002; Fruton, 2002; Nguyen *et al.*, 2008).

Los ejemplos bien conocidos de proteasas aspárticas incluyen la quimosina, la cathepsina D, la cathepsina E y la pepsina. El banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) y la base de datos MEROPS clasifican ocho subfamilias dentro de las proteasas aspárticas con la secuencia 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 (Casella *et al.*, 2005; Rawlings y Bateman, 2009).

### 3.1 Aplicaciones biotecnológicas de las proteasas ácidas

Los microorganismos representan una fuente de enzimas debido a la facilidad de manipulación genética y su amplia diversidad. A escala industrial, son preferidos debido a varias ventajas, tales como menores costos de fabricación, producción a gran escala en fermentadores industriales, rápido desarrollo y ningún efecto por variaciones estacionales (Singh *et al.*, 2019). Dentro de las aspartil proteasas de origen microbiano, las de *Bacillus subtilis* se usan en la producción temprana de natto, un alimento tradicional japonés que se origina a través de la fermentación de semillas de soja. Las proteasas involucradas en este proceso son importantes para el desarrollo de los principales sabores asociados a través de la hidrólisis de las proteínas de esta leguminosa (Borah *et al.*, 2012).

**Figura 1.3** Mecanismos químicos y cinéticos de la catálisis de la proteasa aspártica



Fuente: Tomado de Mandujano-González *et al.*, 2016

(A) Modificado de Northrop (2001) E: sitio activo en ciclo; ES: sustrato unido al sitio activo; ES1: sustrato unido al sitio activo en donde los electrones se extienden en un movimiento antihorario a través del carbonilo sensible; ES2: intermedio unido a una forma diprotonada de la enzima; ES3: zwitterión intermedio unido a la forma monoprotónica de la enzima; EP: lanzamiento del producto; E': desprotonación y rehidratación de la enzima. (B) Modificado de Veerapandian *et al.*, 1992.

Las aspartil proteasas también son muy utilizadas dentro de la industria de los quesos. Su propiedad más significativa es la capacidad de coagular las proteínas de la leche, ya que son capaces de hidrolizar el enlace peptídico específico Phe 105-Met 106 en la caseína bovina para generar  $\kappa$ -caseína y macromoléculas. También su actividad catalítica puede conferir diferentes sabores agradables al paladar, por ejemplo, la proteasa de *Pseudomonas fluorescens* R098 hidroliza diferentes péptidos encontrados en el queso, dando el gusto amargo al producto (Koka y Weimer, 2000; Jacob *et al.*, 2011; Rani *et al.*, 2012). La enzima que tradicionalmente se emplea para la coagulación de la leche es la quimosina, comúnmente conocida como cuajo animal, el cual es extraído de estómagos de rumiantes. Sin embargo, debido a la baja disponibilidad de estos órganos y a la gran demanda de queso, el suministro de este tipo de agente coagulante disminuyó considerablemente. Varios factores como, el alto precio, las ideas religiosas (por ejemplo, el islam y el judaísmo), la dieta (vegetarianismo) o la prohibición del cuajo de ternera recombinante en Francia, Alemania y los Países Bajos, han fomentado la búsqueda de fuentes alternativas de enzimas coagulantes de la leche (Roseiro *et al.*, 2003), dando lugar a que las investigaciones sean dirigidas hacia al descubrimiento de actividades enzimáticas principalmente de origen microbiano, que podrían reemplazar satisfactoriamente a las de origen animal (Merheb-Dini *et al.*, 2010). La Tabla 1.2 muestra algunas investigaciones sobre proteasas ácidas de origen bacteriano con diferentes propiedades utilizadas en la industria quesera (Jacob *et al.*, 2011).

### 3.2 Aspartil proteasas fúngicas

Los hongos como productores de enzimas, se usan comúnmente en las industrias debido a varias razones técnicas, incluida la posibilidad de obtener una alta concentración de las mismas en el medio de fermentación. Estos eucariontes producen una variedad muy amplia de proteasas, dentro de las cuales se incluyen las ácidas. Este tipo de enzimas tienen un pH óptimo entre 4 y 4,5 y son estables entre pH 2,5 y 6,0. Dichas propiedades bioquímicas, son particularmente útiles en la industria del queso debido a sus estrechas especificidades de pH y temperatura (Hajji *et al.*, 2010).

Los principales hongos productores de proteasas ácidas son los mucorales, que comprenden a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Absidia* y *Cunninghamella*. Las de *Mucor pusillus* y *Mucor miehei* son conocidas como mucor reninas. También se ha descrito que el hongo fitopatógeno *Cryphonectria parasitica*, secreta una aspartil proteasa (Demain y Adrio, 2008). Estas enzimas poseen una alta actividad de coagulación de la leche y baja actividad proteolítica, lo que les permite ser utilizadas como sustitutos de la renina en la industria del queso (Maheshwari *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002). Las proteasas ácidas fúngicas son mayormente aplicadas en tres grandes industrias: de bebidas, médica y farmacéutica; y la industria de los alimentos. En la primera, se sabe que la mayoría de las bebidas a base de frutas procesadas industrialmente se clarifican para evitar la turbidez. En la fabricación de jugos y ciertas bebidas alcohólicas, se usan las proteasas ácidas de *Aspergillus saitoi* (aspergiloepsina I) para degradar las proteínas que dan mal aspecto al producto (Sumantha *et al.*, 2006).

**Tabla 1.2** Investigaciones sobre proteasas de origen bacteriano en la coagulación de la leche

Bacteria	Propiedades	Referencias
<i>Myxococcus xanthus</i>	Masa molecular: 40 kDa, mayor actividad de coagulación a pH 6 y a 37°C. Rendimiento aceptable y propiedades de la cuajada en experimentos de elaboración de queso. Clonada con éxito en <i>Escherichia coli</i> .	Poza <i>et al.</i> (2003) Poza <i>et al.</i> (2004)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Permite obtener productos de hidrólisis de la $\kappa$ -caseína similares a los obtenidos con la aspartil proteasa de <i>Rhizomucor miehei</i> , aplicados efectivamente en la fabricación de queso Camembert.	Sato <i>et al.</i> (2004)
<i>Nocardioopsis</i> sp.	Los extractos extracelulares obtenidos de esta bacteria tienen la capacidad de coagular la leche. Se tienen la optimización del rendimiento en la producción de la enzima en condiciones de fermentación.	Cavalcanti <i>et al.</i> (2004) Cavalcanti <i>et al.</i> (2005)
<i>B. subtilis</i>	La relación entre la coagulación de la leche y la actividad proteolítica es comparable con las proteasas fúngicas comerciales, además posee alta termoestabilidad.	Dutt <i>et al.</i> (2008, 2009) Shieh <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus licheniformis</i>	La proteasa obtenida de esta bacteria presenta una cinética típica para la coagulación de la leche.	Ageitos <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Jacob *et al.*, 2011

En la fermentación de sake, una bebida alcohólica de origen japonés, las aspartil proteasas de *Aspergillus oryzae* determinan el sabor del producto final debido a la forma en que hidrolizan las proteínas del arroz al vapor para liberar péptidos y aminoácidos (Shindo *et al.*, 1998). Las proteasas ácidas de *Aspergillus niger* están presentes en la disminución de la turbidez en el jugo de kiwi durante el almacenamiento (Dawes *et al.*, 1994; Falconer *et al.*, 2010). En el jugo de cereza, al adicionar la proteasa ácida de *Aspergillus niger*, comercialmente conocida como ENZECO, ayuda a la reducción de la turbidez de manera significativa, pero también tiene un bajo impacto en la clarificación durante el almacenamiento en frío (Pinelo *et al.*, 2010). Esto también sucede en la producción de jugo de grosella negra, donde se utilizan proteasas ácidas comerciales de *A. niger* (proteasa de aminoácidos A, Deapsin 2P, proteasa ácida fúngica ENZECO) y de *M. miehei* (Novozyme 89L) (Landbo *et al.*, 2006; Byarugaba-Bazirake *et al.*, 2013). Sobre la industria médica y farmacéutica existen diferentes reportes donde se menciona que las aspartil proteasas disponibles comercialmente como Nortase y Luizym, se utilizan para mejorar la digestión y para el tratamiento de ciertos síndromes de deficiencia de enzimas líticas. Otro ejemplo es la brinasa, una proteasa ácida de tipo plasmina que hidroliza la fibrina y fibrinógeno, la cual se aplica a los pacientes con hemodiálisis crónica con cánulas arteriovenosas. Estas proteasas también han sido utilizadas en la detección del cáncer de mama, como la catepsina D (Sumantha *et al.*, 2006). Por otro lado, varias proteasas aspárticas de diferentes especies de *Candida* también se han estudiado ampliamente debido a su participación en los procesos de infección de éste patógeno de humanos (Pichova *et al.*, 2001; Chanalia *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2012).

### 3.3 Proteasas aspárticas fúngicas en la industria de los alimentos

Los hongos que producen proteasas que coagulan la leche son ubicuos y pueden aislarse fácilmente de diversos entornos (Tubesha y Al-Delaimy, 2003). Dentro de los múltiples estudios que hay de estos coagulantes se han establecido tres especies para la producción a gran escala, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *C. parasitica*. Comercialmente, la enzima nativa más importante para la fabricación de queso se aísla del *R. miehei* (Jacob *et al.*, 2011; Ward, 2012). En la Tabla 1.3 se muestran investigaciones de coagulantes de diferentes orígenes, con diversas características. En virtud de las propiedades que estas enzimas coagulantes poseen, es que las proteasas ácidas fúngicas a lo largo del tiempo han ido reemplazado al cuajo animal, facilitando la expansión de la industria de la fabricación de queso (Koka y Weimer, 2000).

Además de su uso extensivo en la industria láctea, las proteasas ácidas derivadas de hongos también se han aplicado en la producción de condimentos y en la mejora de alimentos ricos en proteínas como el pan y productos relacionados. El gluten que se encuentra en la harina de trigo es una proteína insoluble que determina las propiedades de la masa. El tratamiento enzimático de la masa facilita su manejo y también reduce el tiempo de mezcla. Las proteasas de *A. oryzae* se usan para modificar el gluten, lo que resulta en un mayor volumen de pan y en la producción de una gama más amplia de productos, éstas mismas enzimas en combinación con *Lactobacillus*, al agregarse a la harina de trigo pueden ayudar a los pacientes celíacos a consumir pan de trigo (Rao *et al.*, 1998; Rizzello *et al.*, 2007; Theron y Divon, 2014).

**Tabla 1.3** Investigaciones sobre nuevas proteasas microbianas

Microorganismos	Propiedades	Referencias
Pleurotus sajor-caju (hongo de la pudrición blanca)	Actividad de coagulación en condiciones de fabricación de queso.	Moharib (2007)
Mucor bacilliformis	Alta similitud estructural con la quimosina bovina. Termoestabilidad inferior a la proteasa <i>R. miehei</i> .	Venera <i>et al.</i> (1997) Machalinski <i>et al.</i> (2006)
Thermoascus aurantiacus	La hidrólisis enzimática de la caseína bovina difirió en gran medida de los patrones de proteólisis generados por la quimosina bovina.	Merheb <i>et al.</i> (2007)
Termomucor indica-seudaticae N31	El extracto enzimático crudo mostró una alta coagulación de la leche y una baja actividad proteolítica y baja termoestabilidad	Merheb-Dini <i>et al.</i> (2010)
Metschnikowia reukauffii	Actividad coagulante de la leche. Clonada con éxito en <i>E. coli</i> .	Chi <i>et al.</i> (2009) Li <i>et al.</i> (2009)
Piptoporus soloniensis	La masa molecular de 38 kDa con un punto isoelectrico de 3.9. Similar a la quimosina de los terneros lecheros, posee una actividad máxima de coagulación de la leche a 35-40°C y fue más estable a pH 6 y por debajo de 40 ° C.	El-Baky <i>et al.</i> (2011).

La calidad organoléptica de la carne es de suma importancia para su comercialización. Numerosos estudios han demostrado que los consumidores pagan más por la carne tierna. La proteasa aspártica de *A. oryzae* ha contribuido con estas características ya que se utiliza comercialmente para mejorar el aspecto del este alimento en este sentido (Bekhit *et al.*, 2014).

En investigaciones recientes se ha descubierto que los hongos patógenos también son productores de proteasas ácidas extracelulares, con gran potencial biotecnológico. Un ejemplo de ellos es *Ustilago maydis*, agente causal del carbón del maíz, que produce una proteasa ácida que presenta su mayor actividad catalítica a un pH y una temperatura de 4 y 45°C, respectivamente, con un peso molecular de 74 kDa y un punto isoeléctrico de 5.5 (Mercado-Flores *et al.*, 2003).

Otro hongo fitopatógeno es *Sporisorium reilianum*, el responsable de causar el carbón de la espiga en el maíz, este hongo es capaz de producir una proteasa ácida (Eap1), la cual ya fue purificada y caracterizada bioquímicamente, presentando un peso molecular de 41 kDa, estable en un amplio intervalo de pH y temperatura con óptimos de 3 y 45°C, respectivamente. Esta enzima posee la capacidad de coagular las proteínas de la leche, por lo que puede ser aplicada en la industria de los quesos (Mandujano-González *et al.*, 2013).

#### 4. Métodos de producción de las proteasas microbianas

El costo general de la producción de enzimas y el procesamiento posterior es el mayor obstáculo contra la aplicación exitosa de cualquier tecnología en la industria de las enzimas. Muchas investigaciones se han orientado a la optimización de métodos para aumentar los rendimientos de las proteasas con respecto a sus requerimientos industriales. Los enfoques recientes para lograrlo incluyen selección de cepas hiperproductoras, clonación y sobreexpresión, lote alimentado, fermentaciones de quimiostato y optimización del medio de fermentación mediante un enfoque estadístico, como la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Gupta *et al.*, 2002).

La producción de proteasas ácidas extracelulares en microorganismos está fuertemente influenciada por los componentes de los medios, como la variación en la relación C/N, presencia de algunos azúcares de fácil asimilación, como la glucosa, así como de iones metálicos. Las fuentes de nitrógeno como los aminoácidos tienen efecto sobre la síntesis de proteasas. Además de esto, otros factores físicos, como la aireación, la densidad del inóculo, pH, temperatura y la incubación, también afectan la cantidad de enzima producida. Para aumentar la producción a nivel industrial, se han utilizado varias estrategias en fermentador, como son, el lote controlado y lotes alimentados usando un control simultáneo en la concentración de glucosa y de iones de amonio, en la tensión de oxígeno y en el pH (Hameed *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2002; Puri *et al.*, 2002).

En los últimos años, ha habido una gran cantidad de esfuerzo en investigación y desarrollo centrado en el uso de métodos de aproximación estadística, utilizando diferentes paquetes de software para la optimización del proceso, con el objetivo de obtener altos rendimientos de proteasas en el medio de fermentación. Entre los métodos más usados están la fermentación en estado sólido, principalmente para producir proteasas de *Aspergillus* y *Mucor*, mientras que por fermentación sumergida se obtienen fundamentalmente proteasas de *M. miehei*, *C. parasitica* y *Bacillus* (De Coninck *et al.*, 2000; Puri *et al.* 2002).

La fermentación en estado sólido (FES) se realiza en bandejas con un espesor de sustrato entre 1 y 10 cm, o en tambores rotatorios que facilitan la aireación del sustrato. El microorganismo crece sobre el medio sólido humedecido, constituido preferentemente por salvado de trigo o arroz u otros residuos agroindustriales con agua y en algunos casos otros aditivos, esterilizado habitualmente por vapor. Como en todo sistema de FES es difícil el control del pH y la suplementación con componentes del medio durante el crecimiento del microorganismo. Cabe mencionar que hay poca información disponible acerca de la cinética del proceso y la interacción de las distintas variables, lo que vuelve de interés su estudio. Finalmente, la proteasa es usualmente recuperada por extracción del sustrato fermentado con agua o buffer de pH adecuado, filtración y purificación por los métodos habituales, para finalmente ser comercializada en forma líquida o sólida, esta última obtenida por precipitación con solventes o secado (Gupta *et al.*, 2002; Germano *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005).

Para la Fermentación Sumergida (FS), el equipamiento tradicionalmente usado para la producción de enzimas consiste en altos tanques cilíndricos de acero inoxidable de 10 a 100 toneladas de capacidad, con fuertes agitadores mecánicos y aireadores. Muchos de los componentes del medio de cultivo son productos agrícolas baratos de provisión continua y calidad uniforme. El medio es relativamente concentrado 10-15 % de sólidos secos, con alto contenido de proteínas y se evita comúnmente que la concentración de aminoácidos libres sea elevada pues esto frecuentemente inhibe la producción de proteasas. La esterilización es en general un proceso de alta temperatura y de corto tiempo. El consumo de carbohidratos es alto, pero compuestos como la glucosa que tienden a reprimir la producción de la enzima, son mantenidos al mínimo o agregados por alimentación a distintos tiempos, o bien son reemplazados por carbohidratos de lenta metabolización como lactosa o almidón. Al final los sólidos secos y la viscosidad deben ser bajos, la biomasa fácilmente separable y los carbohidratos y aminoácidos libres mínimos. Las enzimas extracelulares son producidas en cultivos por lote en ciclos de 30-150 h (Kalisz, 1988; Sandhya *et al.*, 2005; Sun y Xu, 2009).

Cada técnica tiene ventajas particulares, la FES presenta bajo costo de producción, requiere menos energía y espacio, hay menos problemas en el procesamiento, un menor requerimiento de agua, el producto es estable y hay una mayor productividad (Das y Mukherjee, 2007; Sun y Xu, 2009). Por otro lado, la FS tiene ventajas en el control de procesos y una fácil recuperación de enzimas extracelulares, micelios o esporas. Sin embargo, los productos son diluidos y los extractos enzimáticos pueden ser menos estables que los obtenidos de la FES. Los principales problemas en esta última a gran escala para el crecimiento de hongos son la eliminación limitada de agua y calor. En FS, el agua está presente abundantemente y las variaciones en la temperatura, la concentración de oxígeno y los nutrientes son pequeñas (Biesebeke *et al.*, 2002). En contraste, en la FES una cantidad mínima de agua permite la producción de metabolitos en una forma más concentrada, lo que hace que el proceso posterior consuma menos tiempo y sea menos costoso. Estas condiciones favorecen el crecimiento de hongos filamentosos, como normalmente crecen en la naturaleza en sustratos sólidos, como trozos de madera, hojas, raíces de plantas y otros materiales orgánicos naturales. Además, el bajo contenido de humedad puede minimizar los problemas de contaminación bacteriana durante la fermentación (Germano *et al.*, 2003).

Otra estrategia de producción es hacer uso de las técnicas de DNA recombinante, que han sido desarrolladas gracias a los avances sobre el conocimiento de la fisiología y el metabolismo microbiano, permitiendo el diseño de procesos donde los microorganismos se utilizan como fábricas celulares, mejorando con esto las características específicas de las enzimas ya estudiadas y produciendo cepas modificadas que expresan proteínas a gran escala en hospederos de expresión heteróloga (Juturu y Wu, 2012). Debido a esto, en la última década, ha aumentado de forma exponencial la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico e industrial. Las fases necesarias a nivel comercial son: la clonación del gen de interés en un vector de expresión, la transformación del microorganismo hospedero (sistema de expresión), el proceso de selección de los transformantes, el crecimiento del microorganismo y expresión en biorreactores y por último, la recuperación y purificación de la proteína (Ongley *et al.*, 2013). El tipo de sistema de expresión a utilizar se selecciona en función de diferentes parámetros, como el rendimiento de la producción, el éxito en las modificaciones y en el procesamiento post-traducciona, el plegamiento y la glicosilación de las proteínas de interés, la viabilidad económica y el posterior proceso de purificación. Para este fin se han empleado bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Hay diversos reportes de clonación de un gran número de aspartil proteasas de varias fuentes con mejores propiedades que las nativas (Juturu y Wu, 2012; Sharma y Kumar, 2013; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2018).

## 5. Conclusión

Las proteasas son ampliamente utilizadas en la industria, ocupando el 60 % de las ventas totales de enzimas. Dentro de éstas se encuentran las aspartil proteasas, que son aplicadas principalmente en la industria láctea, específicamente en la elaboración de queso, por su capacidad de hidrolizar las proteínas de la leche; y en la industria de las bebidas, siendo las aspartil proteasas las principales enzimas que ayudan en la clarificación de las bebidas hechas a base de frutas. Las proteasas ácidas de origen fúngico son las más utilizadas debido a sus características que las hacen atractivas para los procesos industriales. A causa de la gran demanda y la búsqueda constante de enzimas con mejores características, es que las investigaciones se están centrando en encontrar nuevas cepas que permitan obtener mayores actividades y mejores características. De la misma forma, también se están desarrollando métodos para mejorar los rendimientos en los procesos de producción o en las características de las aspartil proteasas ya identificadas, mediante todo tipo de fermentaciones o expresiones heterólogas de los genes de interés en otros huéspedes.

## 6. Bibliografía

- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Sestelo, A.B.F., Poza, M., y Villa, T.G. (2007). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*. 103:2205–2213.
- Andrade, V.S., Sarubbo, L.A., Fukushima, K. (2002). Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:106–110.
- Aoki, W., Kitahara, N., Miura, N., Morisaka, H., Yamamoto, Y., Kuroda, K., y Ueda, M. (2012). *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. *PLOS ONE* 7:e32513.
- Avilés, X., Guasch, A., y Vendrell, J. (1994). Activación de precursores de proteínas. *Investigación y ciencia*. 210:74–81.
- Banerjee, G., y Raya, A.K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 31:3–27.
- Barret, A.J., Rawlings, N.D., y O'Brien, E.A. (2001). The MEROPS database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology*. 134:95–102.
- Barret, A.J., Tolle, D.P., y Rawlings, N.D. (2003). Managing peptidases in the genomic era. *The Journal of Biological Chemistry*. 384:873–882.
- Barrett, A. J. (1994). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases Vol. 244. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 1–15.
- Barrett, A. J. (1995). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. Vol. 248. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 183.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. (2002). De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochemistry*. 37:1103–1109.
- Bekhit, A.A., Hopkins, D.L., Geesink, G., Bekhit, A., y Franks, P. (2014). Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54:1012–1031.
- Biesebeke, R.T., Ruijter, G., y Rahardjo, Y.S.P. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*. 2:245–248.
- Blundell, T.L., y Johnson, M.S. (1993). Catching a common fold. *Protein Science*. 2:877–883.
- Borah, D., Yadav, R.N.S., Sangra, A., Shahin, L., y Chaubey, A.K. (2012) Production, purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* from tea garden soil samples of Dibrugarh, Assam. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 3:124–125.
- Byarugaba-Bazirake, G.W., van Rensburg, P., y Kyamuhangire, W. (2013). The influence of commercial enzymes on wine clarification and on the sensory characteristics of wines made from three banana cultivars. *American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*. 3:41–62.
- Cascella, M., Micheletti, C., Rothlisberger, U., y Carloni, P. (2005). Evolutionarily conserved functional mechanics across pepsin-like and retroviral aspartic proteases. *Journal of the American Chemical Society*. 127:3734–3742.
- Cavalcanti, M.T.H., Martinez, C.R., Furtado, V.C., Neto, B.B., Teixeira, M.F.S., Lima, J.L., y Porto, A.L.F. (2005). Milk-clotting protease production by *Nocardiopsis sp* in an inexpensive medium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:151–154.
- Cavalcanti, M.T.H., Teixeira, M.F.S., Filho, J.L.L., y Porto, A.L.F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiopsis sp*. *Bioresource Technology*. 93:29–35.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Jodha, D., y Singh, J. (2011). Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews in Medical Microbiology*. 22:96–101.

- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., y Wang, X. (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential application. *Biotechnology Advances*. 27:236–255.
- Coates, L., Erskine, P.T., Wood, S.P., Myles, D.A., y Cooper, J.B. (2001). A neutron Laue diffraction study of endothiapsin: implications for the aspartic proteinase mechanism. *Biochemistry*. 40:13149–13157.
- Das, K., y Mukherjee, A.K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*. 42:1191–1199.
- Davies, D.R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinase. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 19:189–215.
- Dawes, H., Boyes, S., Keene, J., y Heatherbell, D. (1994). Protein instability of wines—influence of protein isoelectric point. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45:319–326.
- De Coninck, J., Bouquelet, S., Dumortier, V., Duyme, F., Denantes, IV. (2000). Industrial media and fermentation processes for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophile*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24:285–290.
- Demain, A.L y Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38:41–55.
- Dunn, B. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*. 102:431–4458.
- Dutt, K., Gupta, P., Saran, S., Misra, S., y Saxena, R.K. (2009). Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158:761–772.
- Dutt, K., Meghwanshi, G.K., Gupta, P., y Saxena, R. K. (2008). Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 46:513–518.
- El-Baky, H., Link, D., Nimtz, M., y Gunter, R. (2011). PsoP1, a milk clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28:10311–10316.
- Falconer, R.J., Marangon, M., Van Sluyter, S.C., Neilson, K.A., Chan, C., y Waters, E.J. (2010). Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:975–980.
- Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Van Middlesworth., J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Chih-Tai, L., Herber, W.K., Dixon, R.A.F., y Darke, P.L. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:14209–14191.
- Fox, J.W., Shannon, J.D., y Bjarnason, J.B. (1991). Proteinases and their inhibitors in biotechnology. Enzymes in biomass conversion. ACS Symposium Series. 460:62–79.
- Fruton, J. (2002). A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly Review of Biology*. 77:127–147.
- Fukasawa, K.M., Hata, T., Ono, Y., y Hirose J. (2011). Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *Journal of Amino Acids*. 2011:1–7.
- Germano, S., Pandey, A., Osaku, C.A. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:246–251.
- Govind, N.S., Mehta, B., Sharma, M., y Modi, V.V. (1981). Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*. 20:2483–2485.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:15–32.

- Hajji, M., Hmidet, N., Jellouli, K. (2010). Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*. 45:1746–1752.
- Hameed, A., Keshavarz, T., Evans, C.S. (1999). Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74:5–8.
- Horimoto Y., Dee D., Yada R. (2009). Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnology*. 25:318-324.
- Jacob, M., Jaros, D., y Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64:14-34.
- Juturu, V y Wu, J.C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30:1219-1227.
- Kalisz, H.M. (1988). Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 36:1–65.
- Kamal, S., Rehman, S., y Iqbal, H.M.N. (2017). Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation: *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 36:511–522.
- Koka, R., y Weimer, B.C. (2000). Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* R098 to hydrolyze bitter peptides from cheese. *International Dairy Journal*. 10:75–79.
- Landbo, A.K., Pinelo, M., Vikbjerg, A., Let, M., y Meyer, A.S. (2006) Protease-assisted clarification of black currant juice: synergy with other clarifying agents and effects on the phenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:6554–6563.
- Li, J., Chi, Z., Liu, Z., Yue, L., Peng, Y., y Wan, L. (2009). Cloning and characterization of a novel aspartic protease gene from marine-derived *Metschnikowia reukaufii* and its expression in *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 159:119– 132.
- Machalinski, C., Pirpignani, M.L., Marino, C., Mantegazza, A., y Bonino, M.B.J. (2006). Structural aspects of the *Mucor bacilliformis* proteinase, a new member of the aspartyl-proteinase family. *Journal of Biotechnology*. 123:443– 452.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:461–488.
- Mandujano- González, V., Arana-Cuenca, A., Anducho-Reyes, M., Téllez-Jurado, A., González-Becerra, A., y Mercado-Flores, Y. (2013). Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. *Protin Expression and Purification*. 92:214-222.
- Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M.A., y Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Revista Iberoamericana de Micología*. 33:76–82.
- Mercado-Flores, Y., Guerra- Sánchez, G., Villa-Tanaca, L., y Hernández-Rodríguez, C. (2003). Purification and characterization of an extracellular non-aspartyl acid protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Current Microbiology*. 47:408-11.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., y Da Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. 104:127– 131.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., y Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*. 120:87– 93.
- Mótyán, J.A., Tóth, F., y Tözsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 3:923–942.

- Nguyen, J.T., Hamada, Y., Kimura, T., y Kiso, Y. (2008). Design of potent aspartic protease inhibitors to treat various diseases. *Archiv der Pharmazie, Chemistry in life sciences*. 341:523–535.
- Northrop, D. (2001). Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic proteases. *Accounts of Chemical Research*. 34:790–797.
- Ongley S.E., Bian X., Neilan B.A., Muller R. (2013). Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. RSC publishing. *Natural Product Reports*. 30:1121–1138.
- Pérez-Rodríguez, J., Viguera-Morales, Y.S., Téllez-Jurado, A., Ibarra-García, J.A., Álvarez-Cervantes, J., y Mercado-Flores, Y. (2018). Expresión heteróloga de xilanasas y aspartil proteasas de hongos. En: Ciencias Biológicas y de la Salud. Proceedings TII. Ed. Trejo-Macotela, F. R. *ECORFAN-México*. pp. 12-24.
- Pichova, I., Pavlickova, L., Dostal, J., Dolejsi, E., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Weber, J., Ruml, T., y Soucek, M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *European Journal of Biochemistry*. 268:2669–2677.
- Pinelo, M., Zeuner, B., y Meyer, A.S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*. 88:259–265.
- Poldermans, B. (1990). Proteolytic enzymes. En: Proteolytic enzymes in industry: production and applications. Ed. Gerhartz, W. Weinheim, Germany: VCH Publishers. pp. 108–123.
- Poza, M., Prieto-Alcedo, M., Sieiro, C., y Villa, T.G. (2004). Cloning and expression of clt genes encoding milk-clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6337–6341.
- Poza, M., Sieiro, C., Carreira, L., Barros-Velazquez, J., y Villa, T.G. (2003). Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30:691–698.
- Puri, S., Beg, Q.K., y Gupta, R. (2002). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* using response surface methodology. *Current Microbiology*. 44:286–290.
- Rani, K., Rana, R., y Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Research in Life Sciences*. 2:12–18.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., y Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597–635.
- Rawlings, N.D., Barret, A.J., y Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 40:343–350.
- Rawlings, N.D., y Barrett, J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 290:205–218.
- Rawlings, N.D., y Bateman, A. (2009). Pepsin homologues in bacteria. *BMC Genomics*. 10:437–448.
- Rizzello, C.G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M.D., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C., y Gobbetti, M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:4499–4507.
- Roseiro, L.B, Barbosa, M., Ames, J.M., y Wilbey, R.A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara L* for the production of ovine cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 56:76–85.
- Sabotic J., Kos J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:1351–1375.

- 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.
- Santos, L.O., Garcia-Gomes, A.S., Catanho, M., Sodr , C.L., Santos, A.L.S., Branquinha, M.H., y D’Avila-Levy, C.M. (2013). Aspartic Peptidases of Human Pathogenic Trypanosomatids: Perspectives and Trends for Chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*. 20:3116–3133.
- Sato, S., Tokuda, H., Koizumi, T., y Nakanishi, K. (2004). Purification and characterization of an extracellular protease having milk-clotting activity from *Enterococcus faecalis* TUA2495L. *Food Science and Technology Research*. 10:44–50.
- Shah, M.A., Mir, S.A., y Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*. 94:5–16.
- Sharma M., Kumar A. (2013). Xylanases: An overview. *British Biotechnology Journal*. 3:1–28.
- Shieh, C.J., Phan Thi, L.A., y Shih, I.L. (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*. *Biochemical Engineering Journal*. 43:85–91.
- Shindo, S., Kashiwagi, Y., y Shiinoki, S. (1998). Sake brewing from liquefied-rice with immobilised fungal mycelia and immobilised yeast cells. *Journal of the Institute of Brewing*. 104:277–281.
- Singh, R., Singh, A., y Sachan, S. (2019). Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? En: Enzymes in Food Biotechnology. Production, Applications, and Future Prospects. Ed. Kaddus, M. Academic Press. USA. pp. 827–843.
- 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.
- Sun, S.Y., y Xu, Y. (2009). Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. *Bioresource Technology*. 100:1336–1342.
- Theron, L.W., y Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:8853–8868.
- Tubesha, Z.A., y Al-Delaimy, K.S. (2003). Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*. 56:237–241.
- Tyndall, J.D.A., Nall, T., y Fairlie, D.P. (2005). Proteases universally recognize  $\beta$ -strands in their active sites. *Chemical Reviews*. 105:973–1000.
- Veerapandian, B., Cooper, J., Sali, A., Blundell, T., Rosati, R., Dominy, B., Damon, D., y Hoover, D. (1992). Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral intermediate of aspartic proteinases. *Protein Science*. 1:322–328.
- Venera, G.D., Machalinski, C., Zum rrega, H., Biscoglio, M.J., y Bonino, D.J. (1997). Further characterization and kinetic parameter determination of a milk-clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 68:207–216.
- Verma, S., Dixit, R., y Pandey, K. C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in pharmacology*. 7:107.
- Ward O. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 30:1119–1139.
- Wu, W., y Chen, X.L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92:253–262.