

www.bdigital.ula.ve

La tesis fue financiada por el Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (Fundación CIEPE), en conjunto con el Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo” (BIOMI).

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Maestría en Biotecnología de Microorganismo

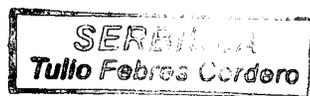
AISLAMIENTO DE UNA CEPA DE *Bacillus subtilis* Y
CARACTERIZACION DE SU ACTIVIDAD PROTEOLITICA

www.bdigital.ula.ve

Lic. Mónica Andrea Mendoza Feria

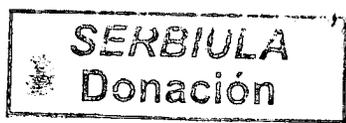
Realizado con la tutoría del

Dr. Pablo García Lugo



Febrero de 2011

Mérida – Venezuela



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios.

A La Universidad de los Andes por el gran aporte a mi formación a lo largo de mi estancia en tan prestigiosa Universidad y en especial a todos los profesores del Postgrado de Biotecnología de Microorganismos los cuales fueron pilar fundamental para la culminación de esta meta personal.

Al Profesor Pablo García Lugo por su apoyo y dirección en la elaboración de mi tesis, por la revisión minuciosa y sus valiosos aportes que enriquecieron el contenido de este trabajo.

A mis compañeros Adriana, Rocío, Yary y Elwi por brindarme su apoyo constante en lo científico y personal.

Al personal que labora en el BIOMI por su apoyo y ayuda.

A la Fundación CIEPE, en especial al Ing. Osmar Morillo por su colaboración y ayuda.

A la Lic. Sonia Morales y al laboratorio dirigido por el profesor Francisco Brito por facilitarme sus instalaciones y equipos para realizar ensayos importantes para el desarrollo de esta tesis.

A la Lic. Agustina Rojas por compartir sus conocimientos que fueron de gran importancia durante el desarrollo de esta tesis y al Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "José Francisco Torrealba" dirigido por el profesor Néstor Añez.

Al Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), por facilitarme sus instalaciones y equipos para realizar mis pasantías. Al Doctor Néstor Caffini por la oportunidad de participar en el laboratorio, a la Doctora Claudia Natalucci por sus recomendaciones y apoyo, al Doctor Marcelo Pardo por aceptar la dirección de mis pasantías haciendo un gran aporte al contenido de este trabajo. A todas las personas que laboran en el LIPROVE por hacerme parte de esa gran familia.

POR ÚLTIMO Y NO POR ELLO MENOS IMPORTANTE, QUIERO AGRADECERLES POR SU AMOR INCONDICIONAL Y APOYO CONSTANTE A MIS PADRES, MI ESPOSO Y MI HERMANA.

Mónica Andrea Mendoza Feria

Profesores que laboran en el Postgrado de Biotecnología de Microorganismos:

Balmore Guerrero

Julio Otoniel

Néstor González

Pablo García

Froilan Contreras

Rubén Gómez

Bernardo Chataing

Francisco Brito

Jorge Paolini

Roberto López

Omaira Márquez

Néstor Añez

Enrique García

Guillermo Bianchi

Guillermo Bianchi P

Carmen Rivero

Víctor García

Félix Fernández

Cesar Pérez

María M Ball

Andrés Yarzabal

Alexis Zambrano

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
1. - INTRODUCCIÓN.....	13
1.1.- Proteasas.....	14
1.2.- Fuente de proteasas.....	14
1.2.1.- Proteasas de plantas.....	15
1.2.2.- Proteasas animales.....	15
1.2.3.- Proteasas de microorganismos.....	17
1.3.- Tipos de proteasas.....	19
1.3.3.1- Exopeptidasas.....	16
1.3.1.1.- Aminopeptidasas.....	16
1.3.1.2.- Carboxipeptidasas.....	17
1.3.2.- Endopeptidasas.....	17
1.4.- Mecanismo de acción de las proteasas.....	21
1.4.1.- Mecanismo de acción de las serín proteasas.....	21
1.4.2.- Mecanismo de acción de las aspártico proteasas.....	22
1.4.3.- Mecanismo de acción de las métalo proteasas.....	23
1.4.4.- Mecanismo de acción de las cisteín proteasas.....	23
1.5.- Proteasas alcalinas de <i>Bacillus spp</i>	25
1.6.- Aplicaciones industriales de las proteasas alcalinas de <i>Bacillus spp</i>	27
1.6.1.- Industria de alimentos.....	27
1.6.2.- Industria de detergentes.....	28
1.6.3.- Industrias del cuero.....	29
1.6.4.- Uso médico.....	30
1.6.5.- Industria farmacéutica.....	30
1.6.6.- Gestión de residuos industriales y domésticos.....	30
1.7.- Antecedentes de la industria de enzimas en Venezuela.....	32
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
2.1.- Problema.....	35
2.2.- Hipótesis	36
2.3.- Objetivos.....	37
2.3.1.- Objetivo general	37
2.3.2.- Objetivos específicos.....	37
3.- MATERIALES Y METODOS.....	39
3.1.- Materiales.....	39
3.2.- Métodos.....	40
3.2.1.- Aislamiento y procesamiento de muestras.....	40
3.2.2.- Rastreo mediante hidrólisis en caseína.....	40

3.2.3.- Identificación de la cepa mediante secuenciamiento del ADNr 16S	41
3.2.3.1.- Extracción de ADN Genómico de la Cepa en estudio	
3.2.3.2.- Detección de ADN en electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %	
3.2.3.3.- Amplificación del gen 16S de ADNr de la cepa en estudio por PCR	
3.2.3.4.- Purificación final del producto de PCR y secuenciamiento de ADNr de la cepa en estudio	
3.2.4.- Caracterización del extracto crudo enzimático (ECE)	
3.2.4.1.- Producción de Proteasas	
3.2.4.2.- Precipitación con Acetona	
3.2.4.3.- Determinación de Proteínas	
3.2.4.4.- Evaluación de la actividad enzimática	
3.2.4.5.- Efecto de almacenamiento a bajas temperaturas	
3.2.4.6.- Ensayo Con Inhibidores	
3.2.4.7.- pH Óptimo	
3.2.4.8.- Temperatura optima	
3.2.4.9.- Estabilidad térmica	
3.2.4.10.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica	
3.2.4.11.- Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática	
3.2.4.12.- Determinación de los valores de V_{max} y K_m para la enzima en estudio	
3.2.4.13.- Ensayo de la Producción de Enzimas Proteolíticas en Biorreactor de 1.3L	
3.2.5.- Purificación parcial del Extracto Crudo Enzimático Parcialmente Purificado	
3.2.5.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante con Docecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	
3.2.5.2.- Electroforesis en geles con tricina desnaturizantes (SDS Tricina-PAGE) del ECE parcialmente purificado con acetona	
3.2.5.3.- Isoelectroenfoque-Zimograma	
3.2.5.4.- Cromatografía de intercambio catiónico Columna HiTrap SP HP	
4.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	50
4.1.- Procesamiento de las muestras y aislamiento de microorganismos.....	50
4.1.1.- Descripción macro morfológica.....	52
4.1.2.- Descripción micro morfológica.....	52
4.2.- Identificación molecular de la cepa en estudio	
4.2.1.- Extracción de ADN genómico	
4.2.2.- Amplificación del gen 16S de ADNr de la cepa	
4.2.3.- Análisis de la secuencia de la cepa	
4.3.- Caracterización del Extracto Crudo Enzimático	
4.3.1.- Electroforesis desnaturizante del ECE	
4.3.2.- Purificación parcial por precipitación con acetona	
4.4.- Evaluación del ECEPP	
4.4.1.- Cromatografía de intercambio catiónico (HiTrip SP HP)	

- 4.4.2.- Esquema de purificación del ECEPP a partir de una columna de intercambio catiónico (CIC) HiTrip SP HP
- 4.5.- Caracterización del ECEPP
 - 4.5.1.- Efectos del almacenamiento a bajas temperaturas
 - 4.5.2.- Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática
 - 4.5.3.- Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática
 - 4.5.4.- Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.
 - 4.5.5.- Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica
 - 4.5.6.- Estudio de estabilidad térmica
 - 4.5.7.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica
 - 4.5.8.- Valores de V_{max} y K_M para la enzima en estudio
- 4.6.- Ensayo de la producción de enzimas proteolíticas en un Biorreactor de 1.3 L

CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	72

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas proteasas alcalinas industrialmente importantes producidos a partir de diferentes <i>Bacillus sp.</i>	30
Tabla 2. Empresas productoras y comercializadoras de enzimas.....	37
Tabla 3. Muestras a partir de la cual se aislaron los microorganismos.....	52
Tabla 4. Diámetro del halo de hidrólisis de los microorganismos que presentaron actividad proteolítica.....	53
Tabla 5. Características de la Cepa en estudio N°044501.....	54
Tabla 6. Afiliación filogenética de la secuencia de la cepa.	56
Tabla 7. Afiliación filogenética de la secuencia de la cepa.....	57
Tabla 8. Esquema de purificación del ECEPP obtenido a partir de <i>Bacillus subtilis</i> utilizando Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP).....	62
Tabla 9. Acción de inhibidores sobre la Actividad proteolítica de la enzima.....	64

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis del enlace peptídico.	14
Figura 2. Clasificación de las proteasas.....	20
Figura 3. Mecanismo catalítico de las serín proteasas.....	26
Figura 4. Mecanismo de acción de las aspártico proteasas (mecanismo general acido-base).....	27
Figura 5. Mecanismo de acción de las Cisteína proteasas.....	28
Figura 6. Comportamiento de las importaciones de enzimas de uso industrial en Venezuela.....	37
Figura 7. Halo de hidrólisis producido por enzimas proteolíticas secretadas por la cepa en estudio.....	53
Figura 8. Bacilo Grampositivo Cepa N° 044501.....	54
Figura 9. Gel de agarosa al 0.8% mostrando el ADN genómico de la cepa N° 044501.....	55
Figura 10. Gel de agarosa al 2% que muestran los resultados de amplificación del gen 16S de ADNr de la Cepa N° 044501.....	55
Figura 11. Electroforesis del ECE en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	58
Figura 12. Electroforesis del ECEPP en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
Figura 13. Isoelectroenfoque y Zimograma del ECEPP.....	60
Figura 14. Cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico realizado al ECEPP.....	60
Figura 15. Zimograma de las fracciones obtenidas por Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP) realizada al ECEPP.....	61
Figura 16. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Tricine- PAGE) realizada a las fracciones obtenidas de la Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP) realizada al ECEPP.....	62
Figura 17. Efectos del almacenamiento a bajas temperaturas.....	63
Figura 18. Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática.....	65
Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.....	66
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	66
Figura 21. Estabilidad térmica luego de cinco min de incubación a diferentes temperaturas y posterior mantenimiento a 4 °C por 30 min.....	67
Figura 22. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática.....	68
Figura 23. Ensayo de la producción de enzimas proteolíticas en medio mínimo enriquecido con caseína al 0.5 % en un Biorreactor de 1.3 L.....	69

RESUMEN

En la actualidad, las bacterias productoras de proteasas han adquirido especial relevancia, a que pueden ser utilizadas en procesos productivos como la industria de los detergentes, alimentos y bebidas, así como la clarificación de cerveza fría y otras bebidas, ablandamiento de carnes rojas, industrias del cuero entre otras. Una de las alternativas viables para mejorar la eficiencia, reducir los costos y aumentar la disponibilidad de algunas enzimas de interés industrial, es el de buscar y seleccionar microorganismos con altas capacidades de producción y evaluar sus condiciones óptimas de crecimiento, producción y actividades enzimáticas. El presente trabajo reporta la obtención, caracterización y purificación parcial de una proteasa proveniente de una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de estiércol de oveja. Esta proteasa se purificó parcialmente con la combinación de precipitación con acetona y cromatografía de intercambio catiónico. Presento una actividad específica de 6 Ucas/mg. La actividad proteolítica fue detectada por Zimograma, donde se observó la presencia de una zona clara de actividad alrededor de la enzima. El SDS-PAGE revela la presencia de dos bandas con pesos moleculares de ~14 y ~29 kDa. La enzima exhibió una actividad óptima a 55 ° C con una estabilidad térmica a 50 °C, presentando un pH óptimo a un rango de 7.0 a 9.0. La caracterización cinética de la enzima presento un comportamiento michaeliano con parámetros cinéticos $V_{max}= 0.046$ Ucas/min y $K_m= 0.192$ mM. Las propiedades exhibidas por la enzima en estudio son fundamentales para la posible utilización de la enzima en diferentes procesos industriales.

1.- INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biocatalizadores que participan en gran número de reacciones químicas y son el objeto de explotación comercial para el uso en detergentes, fármacos, alimentos, industria del cuero e industria química entre otros.

Hasta la fecha se han descrito más de 3.000 tipos diferentes de enzimas, en su mayoría aisladas de microorganismo mesófilos. Estas enzimas funcionan principalmente a un rango estrecho de pH, temperatura y fuerza iónica. Por otra parte el incremento en el uso de enzimas en la industria hace que la búsqueda de nuevos microorganismos productores de enzimas se convierta en una importante línea de investigación, aprovechando la diversidad metabólica. Los microorganismos extremófilos son considerados una fuente importante de enzimas y se espera que sus propiedades específicas desempeñen un papel importante en la aplicación de procesos industriales (Kumar y Takagi, 1999).

De las enzimas industriales el 75 % son de tipo hidrolíticas. Las proteasas son uno de los tres mayores grupos de enzimas industriales y comprenden alrededor del 60 % del total de ventas de enzimas a nivel mundial (Rao et al., 1998).

Las principales proteasas comerciales disponibles de tipo neutro y alcalino, son producidas por microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* (Schallmey et al., 2004). Las proteasas alcalinas secretadas tanto por bacilos neutrófilos y alcalófilos son de particular interés debido a sus amplias aplicaciones en los detergentes para ropa, el tratamiento del cuero, la recuperación o solubilización de proteínas, síntesis orgánica, ablandamiento de carne, producción de oligopéptidos determinados y la recuperación de plata utilizada en películas de rayos X (Saeki Katsuhisa et al, 2007; Gupta et al, 2002; Anwar y Saleemuddin, 1998; Mala et al, 1998).

1.1.- Proteasas

Las proteasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos usando una molécula de agua. La hidrólisis de enlaces peptídicos por la proteasa se denomina proteólisis (Figura 1).

Las enzimas proteolíticas se encuentran presentes en todos los organismos vivos y son esenciales para el crecimiento y la diferenciación celular. Existe gran interés en el estudio de las enzimas proteolíticas, debido principalmente a que estas enzimas no sólo juegan un papel importante en los procesos metabólicos celulares, sino que también han ganado considerable atención en la comunidad industrial (Gupta et al., 2002).

1.2.- Fuente de proteasas

Al ser unas enzimas necesarias desde el punto de vista fisiológico para los seres vivos, las encontramos extendidas en una gran diversidad de fuentes.

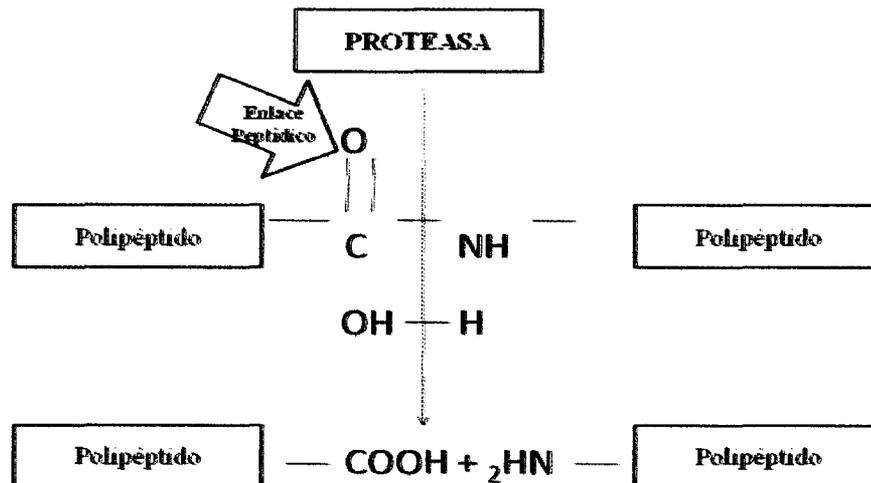


Figura 1. Hidrólisis del enlace peptídico. (Tomado de Rao et al., 1998).

1.2.1.- Proteasas de plantas

El uso de plantas como fuente de proteasas se rige por varios factores tales como la disponibilidad de tierras para el cultivo y la adecuación de las condiciones climáticas para el crecimiento. Por otra parte, la producción de proteasas a partir de plantas es un proceso que requiere mucho tiempo. La papaína, bromelina, keratinases y ficina representan algunas de las proteasas conocidas de origen vegetal.

Papaína: Es una proteasa de plantas tradicionales con un amplio historial de uso. Se extrae del látex de los frutos de papaya. El funcionamiento de la enzima depende de la parte de la planta donde fue extraída, las condiciones climáticas para crecimiento, y los métodos utilizados para su extracción y purificación. La enzima se activa entre pH 5.0 y 9.0 y es estable a 80 - 90 °C en presencia de sustratos. Es ampliamente utilizada en la industria para la preparación de hidrolizados de proteínas.

Bromelina: Es preparada a partir de la madre y el jugo de la piña. El principal proveedor de la enzima es Great Food Biochem., Bangkok, Tailandia. La enzima se caracteriza por ser de tipo cisteínproteasa y se activa a partir del pH 5.0 – 9.0. Se inactiva a una temperatura de 70 °C.

Queratinasa: Algunas de las especies de plantas producen proteasas que degradan el pelo. La digestión de pelo y lana es importante para la producción de aminoácidos esenciales, tales como lisina y para la prevención de la obstrucción de los sistemas de aguas residuales.

1.2.2.- Proteasas de animales

Las proteasas más familiares de origen animal son de páncreas; tripsina, quimotripsina, pepsina, y renina (Boyer, 1971). Estas enzimas se preparan en forma pura en grandes cantidades. Sin embargo, su producción depende de la disponibilidad de ganado para el sacrificio, que a su vez se rige por las políticas agrícolas de cada región.

Tripsina: Es la principal enzima del tracto intestinal responsable de la hidrólisis de las proteínas de los alimentos. Se trata de un proteasa de tipo serina que hidroliza enlaces peptídicos cuyo grupo carboxilo son aportados por residuos de lisina y la arginina. Basado en la capacidad de los inhibidores de la proteasa para inhibir la enzima en el intestino del insecto, esta recibe la atención como un objetivo para el control biológico de plagas de insectos. Su uso en la industria alimentaria se encuentra limitado, ya que los hidrolizados de proteínas generados por la acción de esta enzima presentan un sabor amargo.

Quimotripsina: Se encuentra en el páncreas de los animales. La quimotripsina pura es una enzima costosa y sólo se utiliza para el diagnóstico. Es específica para la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es proporcionados por uno de los tres aminoácidos aromáticos, es decir, la fenilalanina, tirosina y triptófano. Se utiliza extensamente en el tratamiento de hidrolizados de proteínas de la leche. Se almacena en el páncreas en forma de un precursor, quimotripsinógeno.

Pepsina: Proteasa ácida que se encuentra en el estómagos de casi todos los vertebrados. La enzima activa es liberada por el pepsinógeno, por autocatálisis en presencia de ácido clorhídrico. La pepsina es una proteasa de tipo aspártica y se asemeja a la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la cual es responsable de la maduración del VIH-1. Presenta óptima actividad a pH entre 1.0 y 2.0, mientras que el pH óptimo del estómago es de 2.0 a 4.0. La pepsina se inactiva por encima de pH 6.0. Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos entre dos aminoácidos hidrofóbicos.

Renina: Similar a la pepsina, Es una proteasa que se produce como un precursor inactivo en los estómagos de los mamíferos. Se convierte en renina activa por la acción de la pepsina o por su autocatálisis. Se utiliza ampliamente en la industria láctea para producir una cuajada

estable, con buen sabor. Esta enzima es específica para romper un solo enlace peptídico en *k*-caseína para generar *para-k*-caseína y un glucopéptido C-terminal insolubles.

1.2.3.- Proteasas de Microorganismo

La incapacidad de las proteasas de plantas y animales para satisfacer exigencias actuales ha llevado a un creciente interés en las proteasas producidas por microorganismo.

Los microorganismos constituyen una excelente fuente de enzimas debido a su amplia diversidad bioquímica y su susceptibilidad a la manipulación genética. Las proteasas de origen microbiano se prefieren a las enzimas producidas por plantas y animales, ya que poseen casi todas las características deseadas para su aplicación biotecnológica.

Bacterias: La mayoría de las proteasas comerciales, sobre todo neutras y alcalinas, son producidas por microorganismo pertenecientes al género *Bacillus*.

Las proteasas bacterianas neutras son activas a un rango estrecho de pH que va de 5.0 a 8.0 y presentan baja termotolerancia. Por su velocidad de reacción, las proteasas neutras generan menos amargura en hidrolizados de proteínas en los alimentos, por tanto son valiosas para su uso en la industria de los alimentos. Una proteasa neutra procedente de bacterias es insensible a los inhibidores a diferencia de las proteasas neutras procedentes de plantas, haciendo de estas una herramienta útil en la industria cervecera.

Las proteasas neutras bacterianas presentan baja termotolerancia, la cual es ventajosa para el control de su capacidad de reacción durante la producción de alimentos hidrolizados con un bajo grado de hidrólisis. Algunas de las proteasas neutras pertenecen al tipo de las metaloproteasas, es decir, requieren de un ion metálico para su actividad, mientras que otras pertenecen al tipo serínproteasas, las cuales no se ven afectadas por agentes quelantes. Las proteasas alcalinas se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino (pH 10.0), presentando

amplia especificidad por el sustrato. Trabajan a una temperatura óptima de alrededor de 60 °C (Gençkal, 2004).

Hongos: Estos microorganismos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias. Producen proteasas de tipo ácido, neutro y alcalino. Las proteasas fúngicas son activas a un amplio rango de pH (pH 4.0 – 11.0) y exhiben una amplia especificidad por el sustrato. Sin embargo, tienen menor velocidad de reacción y menor termotolerancia al calor que las enzimas bacterianas. Las enzimas fúngicas pueden ser producidas mediante el proceso de fermentación en estado sólido. Las proteasas fúngicas ácidas presentan un pH óptimo entre 4.0 y 4.5 y son estables entre pH 2.5 y 6.0. Estas proteasas son particularmente útiles en la industria quesera debido a su estrecho rango de pH y a la especificidad de la temperatura. Las proteasas fúngicas de tipo neutro, son metaloproteasas que se activan a pH 7.0 y son inhibidas por agentes quelantes. Las proteasas alcalinas fúngicas se utilizan en la modificación de alimentos ricos en proteínas (Gençkal, 2004).

Virus: Las proteasas virales han cobrado importancia, ya que estas proteínas forman parte de virus que causan ciertas enfermedades mortales como el SIDA y el cáncer. Serán proteasas, aspártico proteasa y cisteína proteasa se encuentran presentes en diferentes virus. Todas las proteasas codificadas por virus son de tipo endopeptidasas; no se presentan metaloproteasas.

Pese a que las proteasas se han generalizado en la naturaleza, los microorganismos son la fuente más utilizada por su rápido crecimiento, el reducido espacio necesario para su cultivo y la facilidad con que pueden manipularse genéticamente para generar nuevas enzimas con propiedades alteradas que son requeridas en diversas aplicaciones (Rao et al., 1998).

1.3.- Tipos de proteasas

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en el subgrupo 4 del grupo 3 (hidrolasas) (Rao et al., 1998).

Las proteasas se pueden clasificar de acuerdo a tres criterios principales tales como:

i) Reacción catalizada.

ii) Naturaleza química del sitio catalítico.

iii) Relación evolutiva, revelada por la estructura (Rao et al., 1998).

Como se muestra en la Figura 2, las proteasas se clasifican en exo o endopeptidasas (Gençkal, 2004). Las exopeptidasas rompen enlaces cercanos al extremo carboxilo o amino terminal de la proteína. Las endopeptidasas por su parte, rompen enlaces ubicados en un sitio interno de la cadena polipeptídica.

Con base en el grupo funcional presente en su sitio activo, las proteasas se clasifican en cuatro importantes grupos: Serín proteasas, cisteín proteasas, aspártico proteasas y metalo proteasas (Hartley, 1960). Con base en su secuencia de aminoácidos, las proteasas se clasifican en diferentes familias (Argos, 1987) y se subdividen en “clanes” para dar cabida a grupos de peptidasas que divergen de un antepasado en común (Rawlings & Barrett, 1993).

Proteasa	Modo de Acción*	EC no.
Exopeptidasas		
Aminopeptidasas		3.4.11
Dipeptidil peptidasa		3.4.14
Tripeptidil peptidasa		3.4.16-3.4.18
Carboxipeptidasa		3.4.16
Proteasa tipo Serina		3.4.17
Metaloproteasa		3.4.18
Proteasa tipo Cisteín		3.4.15
Peptidil dipeptidasa		3.4.13
Dipeptidasa		3.4.19
Omega peptidasas		3.4.19
Endopeptidasas		
Serinproteasas		3.4.21-3.4.34
Cisteinproteasas		3.4.21
Asparticoproteasas		3.4.22
Metaloproteasas		3.4.23
Endopeptidasas de origen desconocido		3.4.24
		3.4.99

*Los círculos abiertos representan los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Los círculos sólidos indican los aminoácidos terminales y las estrellas significan las terminales bloqueadas. Las flechas indican los sitios de acción de la enzima.

Figura 2. Clasificación de las proteasas. (Tomado de Rao et al., 1998).

Basado en el pH óptimo de su actividad, se hace referencia a las proteasas ácidas, neutras o alcalinas (Rao et al., 1998).

1.3.1.- Exopeptidasas

Las exopeptidasas actúan cerca de los extremos de la cadena polipeptídica. Sobre la base de su sitio de acción, el carboxilo o amino terminal, estas se clasifican como carboxipeptidasas y aminopeptidasas respectivamente.

1.3.1.1.- Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas actúan de forma libre en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, liberando dipéptido o un tripéptido (Figura 2). Se sabe que al eliminar el N-terminal logramos encontrar heterología en la expresión de proteínas, pero no ocurre esto con las proteínas de origen natural.

Las aminopeptidasas se producen en una amplia variedad de bacterias y hongos. En general, son enzimas intracelulares, hasta ahora no se ha reportado ninguna aminopeptidasa extracelular (Labbe et al., 1974). La aminopeptidasa de *Bacillus licheniformis* tiene un peso molecular de 34.000 Da y contiene 1 g de átomos de Zn^{2+} por cada mol y su actividad se ve reforzada por iones de Co^{2+} . Por otra parte, la aminopeptidasa de *Bacillus stearothermophilus* es un dímero con un peso molecular entre 80.000 – 100.000 Da (Stoll et al., 1976.) y es activado por iones de Zn^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} .

1.3.1.2.- Carboxipeptidasas

Las carboxipeptidasas hidrolizan el enlace peptídico entre el penúltimo residuo y el residuo C-terminal (Figura 2), con lo que se libera el último aminoácido de forma libre. Se pueden dividir en tres grandes grupos: Serín carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y cisteín carboxipeptidasas, basándose en la naturaleza del residuo de aminoácido ubicado en su sitio activo.

La serín carboxipeptidasas aislada de *Penicillun spp.*, *Sacharomyces spp.* y *Aspergillus spp.*, son similares en su especificidad por el sustrato, pero difieren ligeramente en otras propiedades como pH óptimo, estabilidad, peso molecular y efecto de inhibidores (Gençkal, 2004).

1.3.2.- Endopeptidasas

Las endopeptidasas se caracterizan por actuar en las regiones interiores de la cadena polipeptídica, lejos del los extremos amino o carboxilo terminal.

Las endopeptidasas se dividen en cuatro grandes grupos en función de su mecanismo catalítico (Rao et al., 1998):

i) **Serín proteasas**: Se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Son numerosas y generalizadas entre los virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos (Rao et al., 1998).

Este grupo de proteasas son inhibidas irreversiblemente por 3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCl), L-3 carboxytrans 2,3-epoxypropyl-leucylamido (4-guanidine) butane (E-64), diisopropylfluorophosphate (DFP), phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (Gençkal, 2004).

Las serín proteasas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un rango óptimo entre 7.0 y 11.0. Poseen amplia especificidad por el sustrato incluyendo actividad estereolítica y amidasa. Sus pesos moleculares suelen ir entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoelectricos generalmente van entre pH 4.0 y 6.0. Las **serín proteasas alcalinas** son activas aun pH altamente alcalino con un óptimo de pH 10.0, representando el subgrupo más numeroso de las proteasas tipo serina (Rao et al., 1998). Su punto isoelectrico esta alrededor de pH 9.0. Presentan un peso molecular en el rango de 15 – 30 kDa. Hidrolizan el enlace peptídico atacado en el lado carboxilo de aminoácidos específicos como tirosina, fenilalanina o leucina (Gençkal, 2004). Las serinproteasas alcalinas son producidas por bacterias como *Arthrobacter*, *Streptomyces*, y *Flavobacterium spp.*, pero las más conocidas son las subtilisinas de *Bacillus spp.* (Rao et al., 1998).

Las **subtilisinas** de origen *Bacillus*, representan la segunda familia más importante del grupo de las serín proteasas. Se han identificado dos tipos diferentes de estas proteasas alcalinas, subtilisina Carlsberg y subtilisina Novo o proteasas bacteriana Nagase (BPN). Subtilisina Carlsberg es producida por *Bacillus licheniformis*, fue descubierta en 1974 por Linderstrom, Lang y Ottesen. Es ampliamente utilizada en los detergentes. La Subtilisina Novo o BPN es producida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Las dos subtilisinas tienen un peso molecular de

27,5 kDa, pero se diferencian entre sí por 58 aminoácidos ácidos. Presentan propiedades similares, como temperatura óptima de 60 ° C y pH óptimo de 10.0 (Rao et al., 1998).

ii) **Aspártico proteasas:** Son comúnmente conocidas como proteasas ácidas, estas endopeptidasas dependen de un residuo de ácido aspártico para su actividad catalítica. Han sido agrupadas en tres familias; pepsina, retropesina y enzimas de pararetrovirus. En su mayoría presentan máxima actividad a pH bajos (pH 3.0 – 4.0). Sus puntos isoeléctricos se encuentran en un rango de pH 3.0 – 4.5. Sus pesos moleculares van de 30 a 45 kDa. Son inhibidas por pepstatin (Rao et al., 1998).

Las proteasas ácidas microbianas exhiben especificidad frente a los residuos de aminoácidos aromáticos en ambos lados del enlace peptídico, comportamiento similar al de la pepsina pero su acción es menos rigurosa que esta. Las proteasas aspárticas microbianas pueden dividirse en dos grupos: enzimas como la pepsina producida por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Neurospora* y enzimas como la renina, producida por especies de *Endothia* y *Mucor*.

iii) **Cisteín proteasas:** Este tipo de proteasas son producidas tanto en procariontas como en eucariotas. En general, las cisteín proteasas actúan solo en presencia de agentes reductores como ácido cianhídrico (HCN) o cisteína. En el mecanismo catalítico de las cisteín proteasas juega un papel esencial un residuo de cisteína. Este grupo es susceptible a la oxidación y puede reaccionar con variedad de reactivos, metales pesados, yodoacetato, N-etil-maleimida etc (Jenny, 1999).

Basado en la especificidad por la cadena lateral, se dividen en cuatro grupos: papaína, tripsina, específicas para el ácido glutámico y otras. La papaína es la más conocida de las cisteín proteasas, las cuales presentan un pH óptimo neutral, aunque, algunas de ellas como las de origen lisosomal exhiben máxima actividad en medio ácido. Son susceptibles a agentes

sulfhídrido pero no se ven afectadas por diisopropilfluorofosfato (DFP) y agentes quelantes de metales.

Endoproteinasa Arg-C, producida por *Clostridium histolyticum* mediante descomposición anaerobia. Presenta estricta especificidad por los residuos de arginina en el lado carboxilo del enlace atacado y se diferencia de la papaína por su exigencia de requerir calcio. La endoproteinasa Arg-C presenta un punto isoelectrico de pH 4.9 y un peso molecular de 50 kDa. Estreptolisina O, una cisteína proteasa producida por *Streptococcus spp.*, muestra amplia especificidad por sustratos sintéticos, presenta un punto isoelectrico de pH 8.4 y 32 kDa de peso molecular.

iv) **Métalo proteasas:** Se caracterizan por la exigencia de un ion metálico para su actividad. Este grupo incluye enzimas de variedad de orígenes, tales como colagenasas de organismos superiores, las toxinas hemorrágicas de veneno de serpiente y termolisinas de bacterias (Avakov et al., 1990).

Basado en la especificidad de su acción, las metalo proteasas se dividen en cuatro grupos: neutras, alcalinas, Myxobacter I y Myxobacter II. Las proteasas neutras muestran especificidad por aminoácidos hidrofóbicos, mientras que las proteasas alcalinas poseen amplia especificidad. Las proteasas Myxobacter son específicas para residuos pequeños de aminoácidos en ambos lados de los enlaces hidrolizados, mientras que las de tipo II son específicas para residuos de lisina en el lado amino del enlace peptídico.

Todos los tipos de metalo proteasas son inhibidas por EDTA, pero no por agentes sulfidrilos. La Termolisina es una metalo proteasa neutra producida por *Bacillus stearothermophilus*, que consta de un solo péptido sin puentes disulfuro y un peso molecular de 34 kDa. Contiene un átomo de Zn esencial incrustado en una hendidura formada por cuatro lóbulos producto de del plegamiento de la proteína y cuenta con cuatro átomos de Ca que imparten

termoestabilidad a la misma. Termolisina es una proteasas muy estable, con una vida media de 1 hora a 80 °C.

Otra metaloproteasa importante es la Colagenasa, fue la primera enzima descubierta en caldo de cultivo de *Clostridium histolyticum* anaerobio. Más tarde, resulto ser producida por *Achromobacter iophagus* y otros microorganismos como los hongos. Tiene acción muy específica, es decir, actúa solo sobre el colágeno y la gelatina.

La Elastasa es otra metalo proteasa de tipo neutra producida por *Pseudomona aeruginosa* y *Serratia spp.*, son activas a un rango de pH entre 7.0 y 9.0 y tienen un peso molecular en la región de 48 a 60 kDa. Las proteasas de tipo Myxobacter tienen un pH optimo de 9.0 y un peso molecular de 14 kDa y pueden producir lisis de las paredes celulares de *Arthrobacter crystallopoites*, mientras que las metalo proteasas Myxobacter II no pueden lisar células bacterianas.

1.4.- Mecanismo de acción de las proteasas

1.4.1.- Mecanismo de acción de las serín proteasas

Las serín proteasas presentan un mecanismo catalítico bien conocido, compartido por otras enzimas no necesariamente proteolíticas. Este mecanismo consiste en una fase de acilación en la que se forma un intermediario covalente acil-enzima, con liberación del primer producto, y una fase de desacilación en la que una molécula de agua rompe el intermediario con liberación del segundo producto. Todas estas enzimas tienen un centro activo formado por tres aminoácidos absolutamente conservados, Serina, Histidina y Aspartato, conjunto que recibe el nombre de tríada catalítica (Figura 3). Al centro activo de la enzima se une el substrato (Rao et al., 1998).

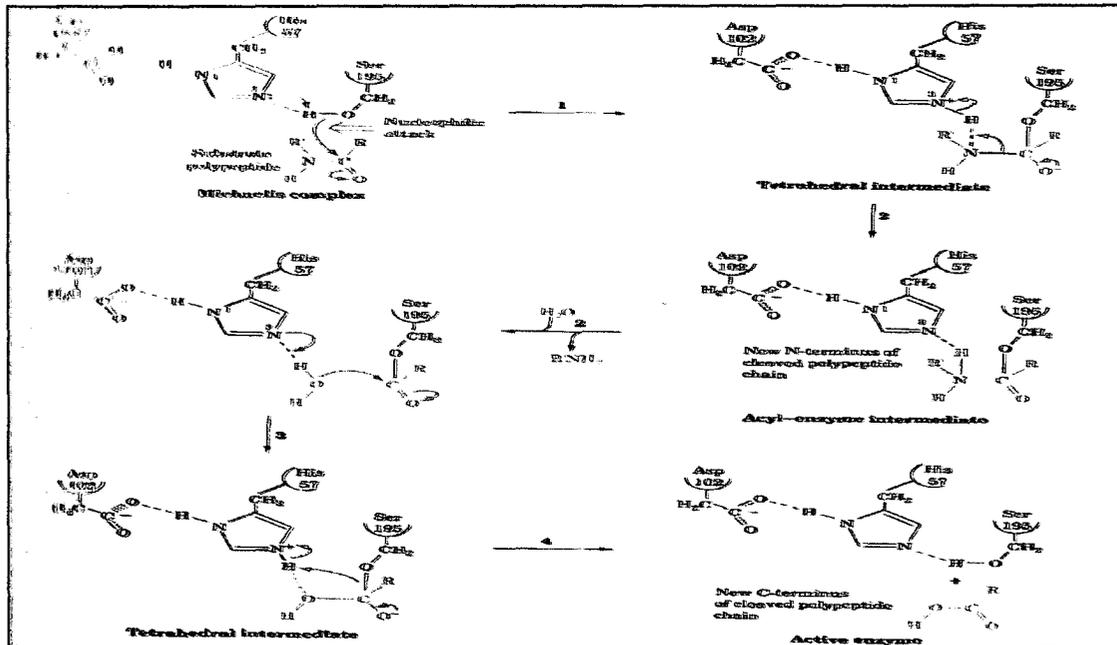


Figura 3. Mecanismo catalítico de las serín proteasas. La reacción implica 1) El ataque nucleofílico del sitio activo de la Ser sobre el átomo de carbono del carbonilo del enlace peptídico escindible para formar el intermediario tetrahédrico; 2) La descomposición del intermediario tetrahédrico al intermediario acil-enzima mediante la catálisis ácida general en el sitio activo de His polarizada con Asp, seguida por la pérdida del producto amino y su reemplazo por una molécula de agua; 3) La inversión del paso dos para formar un segundo intermediario tetrahédrico y 4) La inversión del paso 1 para rendir el producto carboxilo de la reacción y la enzima activa. (Tomado de Voet, 2006).

1.4.2.- Mecanismo catalítico de las aspártico proteasas

Se ha propuesto un mecanismo catalítico general para proteasas de tipo aspártico como penicillopepsin y endothiasepsin. Estudios cristalográficos han demostrado que las enzimas de la familia pepsina son moléculas bilobuladas con un sitio activo situado en una hendidura entre los lóbulos y cada lóbulo contribuye con un residuo de ácido aspártico esencial para la actividad catalítica. Los lóbulos son homólogos el uno al otro y surgen por duplicación de genes. Estudios cinéticos también han sugerido que el mecanismo implica catálisis general ácido-base con la molécula de agua que participa directamente en la reacción (Figura 4) (Rao et al., 1998).

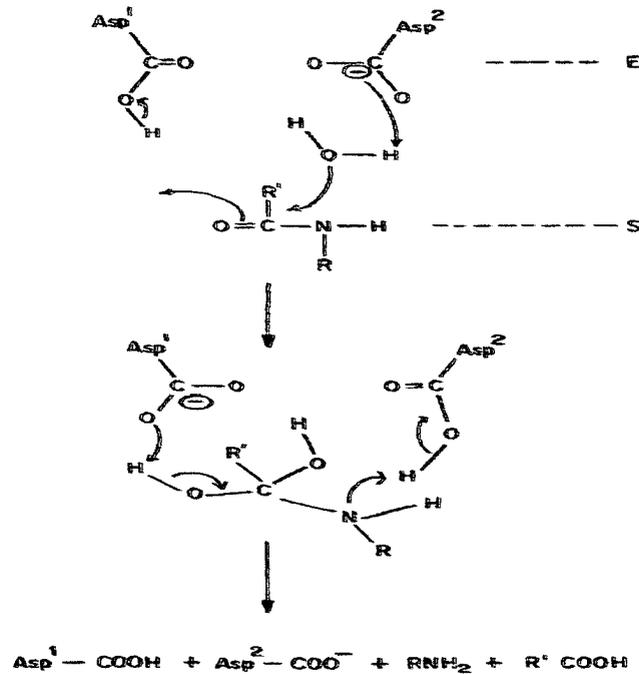


Figura 4. Mecanismo de acción de las aspártico proteasas (mecanismo general ácido-base). (Tomado de Rao et al., 1998)

1.4.3.- Mecanismo catalítico de las metalo proteasas

Estas enzimas dependen de la presencia de cationes bivalentes que son inactivados por diálisis o por la adición de agentes quelantes. Rao et al., 1998 exponen que para termolisina, con base en los estudios de Rayos X de un complejo inhibidor del ácido hidroxámico, se ha propuesto Glu 143 que asiste el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el carbono carbonilo del enlace peptídico escindido, que es polarizado por el ion Zn^{2+} .

1.4.4.- Mecanismo catalítico de las cisteín proteasas

Las cisteín proteasas catalizan la hidrólisis de derivados de ácido carboxílico a través de una vía de doble desplazamiento con la formación de ácido-base y la hidrólisis de un acil-tiol intermedios. El mecanismo de acción de las proteasas tipo cisteína es por tanto, muy similar al de las proteasas de tipo serina.

La papaína, peptidasa vegetal, puede ser considerado como el prototipo de cisteín peptidasas y constituye un buen modelo para esta familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de péptidos, amidas, ester, ester tiol y otros enlaces.

El paso inicial en el proceso catalítico (Figura 5), implica la unión covalente de la enzima libre (Figura 5 a) y el sustrato para formar el complejo (Figura 5 b), esto es seguido por la acilación de la enzima (Figura 5 c) con la formación y liberación del primer producto, el R'-NH₂. En los próximos pasos de deacilación, la acil-enzima reacciona con una molécula de agua para liberar el segundo producto, con la regeneración de la enzima libre.

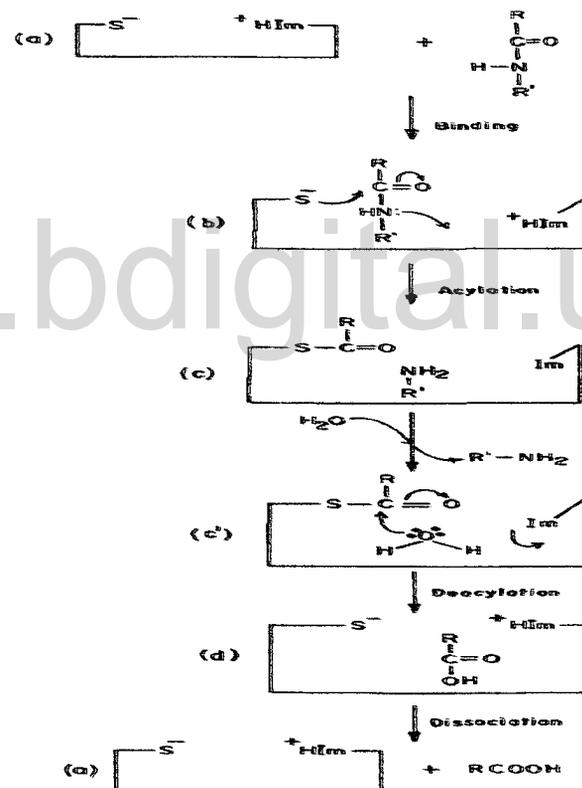


Figura 5. Mecanismo de acción de Cisteína proteasas. Im y ⁺HIm se refieren a la imidazol ya la imidazol protonada, respectivamente. (Tomado de Rao et al., 1998)

1.5.- Proteasas alcalinas de *Bacillus spp*

Las bacterias son el grupo más dominante de los productores de proteasas alcalinas, siendo el género *Bacillus* la fuente más importante. Las proteasas alcalinas producidas por bacilos termófilos y alcalófilos pueden soportar altas temperaturas, pH extremos, agentes químicos de desnaturalización y en entornos no acuosos (Johnvesly & Naik, 2001). El primer informe sobre una enzima alcalina fue publicado Horikoshi en 1971, correspondiente a una proteasa Serínica alcalina extracelular de la cepa *Bacillus alkaliphilic* 221.

Una gran cantidad de especies de *Bacillus* provenientes de diferentes ambientes han sido explorados y explotados para la producción de proteasas alcalinas, pero los productores potenciales de proteasas alcalinas son en su mayoría cepas de bacilos como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus majovensis* (Grupta et al., 2002).

Bacillus subtilis, es un bacilo en forma de bastón, Gram positivo, formador de esporas, aeróbico y por lo general catalasa positivo. Se pueden encontrar sobre todo en ambientes alcalinos, tales como suelo, lagos ambientes neutros y sedimentos de aguas profundas. El estiércol animal, efluentes de alimentos, textiles, curtiembres, las unidades de procesamiento de papas, las unidades de fabricación de papel, hornos de carbonato de calcio y la industria de los detergentes también son buenas fuentes (Akbalik, 2003).

Por otra parte, varios tipos de proteasas alcalinas provenientes de *Bacillus subtilis* se han caracterizado y sus posibles aplicaciones industriales se han explotado. Las principales aplicaciones de estas enzimas se encuentran en la formulación de detergentes, la industria alimentaria, tratamiento del cuero, síntesis química y la gestión de digestión de residuos (Grupta, 2002). Algunas proteasas alcalinas industriales importantes producidas a partir de diferentes *Bacillus sp* se muestran en la Tabla 1.

Las proteasas alcalinas de *Bacillus subtilis* tienen mayor especificidad que tripsina y quimiotripsina, ya que poseen valiosas propiedades para su uso industrial tales como su capacidad para excretar variadas y diferentes enzimas hidrolíticas en un medio de cultivo, su no patogenicidad y la capacidad de crecer en medios de cultivos mínimos explican su aplicación en la industria (Daniel et al., 1984).

Chantawannakul et al., 2002 después de estudiar la capacidad proteolítica de 82 cepas aisladas de la fermentación de soya, encontraron que la cepa *Bacillus subtilis* 38, presento mayor actividad proteolítica (Halo de hidrólisis de 40 mm) con un pH y temperatura óptima de 6,5 y 47 °C respectivamente. Actualmente esta cepa se utiliza como cultivo iniciador para producir soya fermentada.

Tabla 1. Algunas proteasas alcalinas industrialmente importantes producidos a partir de diferentes *Bacillus sp.*

Especies	pH óptimo / estabilidad	Aplicación industrial
<i>Bacillus subtilis</i>	9.5	Agente rendidor (industria del cuero), Fermentación de soya.
<i>Bacillus sp. Y. (BYA)</i>	10.0 – 12.5	Formulaciones de detergentes
<i>Bacillus licheniformis</i>	8.2	Catálisis de aminoácidos
<i>Bacillus sp. (AH-101)</i>	12.0 – 13.0	Depilado en la industria del cuero
<i>Bacillus firmus</i>	8.0	Industria de detergentes
<i>Bacillus sp. (P-001A)</i>	9.5	Producción de biomasa a partir de residuos naturales
<i>Bacillus sp. (Savinase/Durazym)</i>	9.0 – 11.0	Formulaciones de detergentes
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase)	8.2	Síntesis de péptidos biológicamente activos
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	8.5	Detergentes para ropa

Torres y Basurto, 2000 estudiaron la cepa de *Bacillus subtilis* 21 aislada de cultivos de fresa, comprobando actividad antagónica “in vitro” y en invernadero contra los hongos fitopatógenos *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*. Posteriormente Razo et al., 2008 evaluó los posibles mecanismos de acción de esta bacteria encontrando la producción de proteasas y bacteriocinas las cuales pudieran estar involucradas en el mecanismo antagónico de la bacteria *Bacillus subtilis* 21.

Las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, son la fuente más importante del comercio de enzimas microbianas. Pueden ser cultivadas bajo condiciones de temperatura y pH extremos para dar lugar a productos que son a su vez estables en diferentes entornos.

1.6.- Aplicaciones industriales de las proteasas alcalinas de *Bacillus* sp

1.6.1.- Industria de alimentos

Las proteasas alcalinas pueden hidrolizar las proteínas de plantas y animales para producir hidrolizados de péptidos. Estos hidrolizados de proteínas juegan un papel importante en la regulación de la presión arterial y se utilizan en la fórmula de alimentos infantiles específicos de una dieta terapéutica y el fortalecimiento de los zumos de frutas y refrescos.

En los últimos años ha habido un interés sustancial en el desarrollo de métodos enzimáticos para la hidrólisis de las proteínas de soya, gelatina, caseína, el suero y otras proteínas con el fin de preparar hidrolizados de proteínas de alto valor nutricional. En el desarrollo comercial de productos de estas proteínas, se hace hincapié en el logro de un producto consistente, de alto rendimiento, que tiene el sabor deseable y propiedades nutricionales y funcionales (Ward, 1983).

Las proteasas alcalinas de *Bacillus licheniformis* se utilizan para la producción de hidrolizados de proteínas funcionales (Ward, 1983). La proteasa alcalina comercial alcalasa,

es de uso importante para obtener hidrolizados menos amargos (Kumar & Takagi, 1999). La alcalasa ha sido la enzima más adecuada en cuanto a términos de costo, solubilización y otros factores favorables para su uso. Tiene un proceso óptimo a un pH 8.5 y una temperatura de 55 – 60 °C, logrando una solubilización del 94 %. Recientemente otra proteasa alcalina proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens* se encontró en un hidrolizado de proteína de soya, que se aplican principalmente en formulaciones de alimentos infantiles hipoalergénicos (Kumar & Takagi, 1999). En otro estudio Rebecca et al., (1991) informo la producción de hidrolizado de pescado de alto valor nutricional, con proteasas de *Bacillus subtilis*. Perea et al., (1993), por otra parte uso la proteasa alcalina para la producción de hidrolizado de proteína de leche, utilizando suero en un proceso de bioconversión de sueros industriales.

1.6.2.- Industria de detergentes

Las enzimas han sido de interés para la industria de detergentes por su capacidad para ayudar a la eliminación de manchas proteicas y para ofrecer beneficios únicos que no se pueden obtener por las tecnologías convencionales de detergentes (Gupta et al., 2002).

El uso de enzimas en las formulaciones de detergentes es ahora común en los países desarrollados, donde más de la mitad de los detergentes actualmente disponibles contienen enzimas (Chaplin & Bucke, 1990). Las enzimas en los detergentes representan aproximadamente el 30 % del total en toda la producción mundial de enzimas (Horikoshi, 1996) y el 89 % de las ventas totales de las proteasas en el mundo, una parte importante del mercado es capturado por las subtilisinas y/o proteasas alcalinas de muchas especies de *Bacillus* (Gupta et al., 2002).

Los principales productores de las proteasas alcalinas provenientes de especies de *Bacillus* son las empresas Novo Industria A.I.S. y Gist Brocades. Novo produce tres proteasas; Alcalasa de *Bacillus licheniformis*, Esperase de una cepa de *Bacillus licheniformis* y Savinase

de una cepa alcalofila de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por otra parte, Gist Brocades produce y suministra Maxatase de *Bacillus amylolicheniformis*. Alacalsa y Maxatase (las dos principalmente sutilísima) se recomiendan para ser usadas a una temperatura entre 10 – 65 °C y un pH de 7.0 a 10.5. Savinase y Esperase se pueden utilizar hasta un pH de 11.0 y 12.0 respectivamente (Chaplin & Bucke, 1990).

1.6.3.- Industria del cuero

Los métodos convencionales en el tratamiento del cuero implican el uso de productos químicos que ocasionan contaminación ambiental y riesgos de seguridad. Por lo tanto, por razones medioambientales, el tratamiento biológico de la piel se enfoca principalmente en el uso de enzimas ya que estas ofrecen ventajas como el fácil control de la velocidad de reacción y reducción de residuos.

Las proteasas se utilizan en las etapas de remojo, pelambre y rendido de la preparación de pieles. El tratamiento enzimático destruye los pigmentos no deseados, aumenta las aéreas limpias de la piel (Grupta et al., 2002). Las proteasas con actividad elastolítica y queratolítica pueden ser utilizadas en la industria del cuero durante el proceso de rendido, ya que la piel se suaviza por la degradación parcial de las proteínas de la matriz ineterfibrilar (Elastina y queratina). Por lo tanto los preparados enzimáticos con bajos niveles de elastasa y actividad keratinasa (sin actividad colagenasa) son particularmente aplicables en estos proceso (Cowan, 1994). Tradicionalmente el rendido de pieles en un proceso enzimático realizado con la participación de enzimas pancreáticas. Sin embargo, recientemente, el uso de las proteasas alcalinas microbianas ha ido en aumento. La sustitución de agentes químicos para el proceso de depilación en la industria del cuero por enzimas proteolíticas producidas por *Bacillus sp* podría tener importantes impactos económicos y ambientales (Anwar et al., 1998) donde el proceso de pelambre se acelera por el uso de proteasa alcalinas.

1.6.4.- Uso médico

Las proteasas alcalinas también se utilizan para el desarrollo de productos de importancia médica. Gupta et al., (2002) reportaron que Kudrya y Simonenko (1994) aprovecharon la actividad elastolítica de *Bacillus subtilis* 316M para la preparación de elastoterasa, que fue aplicada para el tratamiento de quemadura, heridas purulentas, forúnculos y abscesos profundos. Kim et al., (2001) reportaron el uso de la proteasa alcalina de *Bacillus sp.* cepa CK-114 como agente trombolítico por presentar actividad fibrinolítica (Grupta et al., 2002). Por otra parte, las especies de *Bacillus sp* ha sido reconocido como seguros para la salud humana (Kumar & Takagi, 1999).

1.6.5.- Industria farmacéutica

La gran diversidad y especificidad de las proteasas se utiliza con gran ventaja para el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces. La administración oral de la proteasa de *Aspergillus orizae* (Luizym y Nortase) se ha utilizado como una ayuda digestiva para corregir el síndrome de deficiencia de ciertas enzimas líticas. La colagenasa clostridial y la sutilísima se utilizan en combinación con antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de quemaduras y heridas. Una asparaginasa aislada de *E. coli* se utiliza para eliminar la asparagina del torrente sanguíneo en las diversas formas de leucemia linfocítica. Se encontró que una proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus* es capaz de reemplazar la tripsina en cultivos de células animales (Chiplonkar et al., 1985).

1.6.7.- Gestión de residuos industriales y domésticos

Las proteasas alcalinas tienen potencial aplicación para la digestión de residuos de diversas industrias de procesamiento de alimentos. Las plumas están compuestas en un 90 % de proteína, siendo la queratina su componente principal, es una proteína fibrosa e insoluble. En

todo el mundo varios millones de toneladas de plumas se generan anualmente como residuos de la industria de procesamiento de aves de corral. Las plumas constituyen aproximadamente el 5 % del peso corporal de las aves de corral y se puede considerar una fuente alta de proteínas para la alimentación y los piensos, siempre que su rígida estructura de queratina esté completamente destruida. Un pre tratamiento con NaOH, la desintegración mecánica y la hidrólisis enzimática son el resultado de la solubilización total de las plumas. El producto final es un polvo pesado, de color grisáceo con un alto contenido de proteínas, que podría utilizarse como aditivo de piensos (Kumar & Takagi, 1999).

Teniendo en cuenta su alto contenido de proteínas y aminoácidos estos residuos pueden tener gran potencial para la alimentación animal. En algunos países, la pluma se utiliza como complemento de la alimentación animal en forma de harina de plumas. El desarrollo de métodos enzimáticos y/o microbianos para la hidrólisis de proteínas y aminoácidos de plumas es muy atractiva, ya que ofrece un condiciones de reacción y productos de valor (Gessesse et al., 2003).

Gessesse et al., (2003) aislaron un organismo de un lago alcalino en un área de el Valle del Rift de Etiopia y se identifico como *Bacillus pseudofirmus*. AL-89, la proteasas encontrada ofrece un potencial interesante para la hidrólisis enzimática y/o microbiana de las plumas utilizadas en suplementos alimenticios para animales (Gessesse et al., 2003). Daley (1994) informó de un proceso enzimático con un proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* en el tratamiento de los residuos de plumas de los mataderos de aves de corral. Una formulación que contiene enzimas proteolíticas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Streptomyces sp* y un agente reductor de disulfuro (Tioglicolato) que aumenta la degradación del pelo, ayuda en la limpieza de tuberías obstruidas con el pelo y actualmente está disponible en el mercado. Se ha elaborado y patentado por Genex (Gupta et al., 2002).

1.7.- Antecedentes de la industria de enzimas en Venezuela

La investigación enzimática forma parte importante en la historia de la bioquímica. Se encuentra más allá de todo cuestionamiento que los resultados de las búsquedas de enzimas proteolíticas o peptidasas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas, y no hay duda de que contribuirá aun más en el futuro. La enzimología ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería y papelera entre otras (Pardo, 2004). Una de las más claras indicaciones al respecto radica en las enormes ventas anuales de la industria farmacéutica a causa de la investigación de las diferentes aplicaciones de las peptidasas en el campo de la salud humana. (Barret, 1999).

El mercado de enzimas en Venezuela es considerado de competencia imperfecta, ya que existen pocos ofertantes, quienes influyen de manera importante en el precio final de las enzimas. Por tal motivo se ha creado la necesidad de importar enzimas, ya que la industria nacional no puede cubrir la demanda. De esta manera las empresas que requieren enzimas para la elaboración de productos se ven obligadas a importarlas, con una tendencia cada vez más marcada a través de los años, Figura 6 (Morillo, 2007).

Las empresas biotecnológicas establecidas en el país, realizan los procesos necesarios para producir a gran escala diferentes enzimas, con el principal objetivo de satisfacer el mercado local, generando así fuentes de empleo y disminuyendo la necesidad de realizar importaciones (Ramírez, 2009). Las empresas productoras de enzimas de uso industrial en Venezuela se muestran en la Tabla 2.

La apremiante necesidad de importar enzimas para uso industrial en Venezuela, sugiere promover el desarrollo de investigaciones a nivel nacional con la finalidad de cubrir la demanda industrial a nivel nacional.

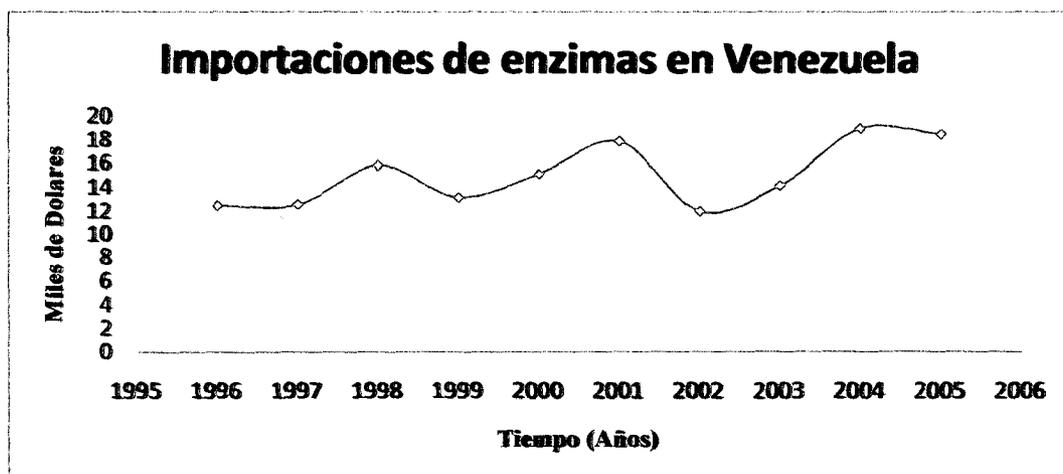


Figura 6. Comportamiento de las importaciones de enzimas de uso industrial en Venezuela. (Tomado de Morillo, 2007)

Tabla 2. Empresas productoras y comercializadoras de enzimas. (Tomado de Morillo, 2007)

Empresa	Localización	Marca Comercial
Girber de Venezuela	San Antonio de Los Altos. Edo. Miranda	Girber
Laboratorio Pharmatest	Guarenas. Edo. Miranda	Tauro
Bixa	Santa Lucia. Edo. Miranda	Bixa
Lavital	Ocumare del Tuy. Edo. Miranda	Cebú
Tecnogramos TGS, C.A.	Chuao, Caracas	-----

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hombre ha recurrido al uso de enzimas en el procesamiento de materias primas desde tiempos inmemorables. Procesos tradicionales, como la producción de bebidas alcohólicas y de pastas fermentadas con levadura pueden observarse en murales egipcios antiguos (Pardo, 2004). Los primeros utensilios de panificación fueron encontrados hace 5000 años en Jericó (Canaan), una de las ciudades más antiguas del mundo. Otros procesos más recientes incluyen preservación de alimentos por fermentación o la transformación de la leche en la elaboración de quesos (Reisner, 1981).

En 1783 se realizaron los primeros experimentos sobre la catálisis in vitro, cuando un monje y naturalista de nacionalidad italiana, Lazzaro Spallanzani, observó que la carne podía ser digerida por los jugos gástricos de los halcones. Kirchoff en 1814 descubrió que la cebada contenía una sustancia que era capaz de transformar la pasta de almidón en azúcar. Años después, Payen y Persoz en 1833, descubrieron el principio activo de esta sacarificación, denominándolo diastasa (del griego: separación), un término aún utilizado en la industria cervecera (Uhlig, 1998).

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación enzimática. Se encuentra más allá de todo cuestionamiento que los resultados de búsquedas de enzimas proteolíticas o peptídicas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas, y no hay duda de que contribuirá aun más en el futuro.

La enzimología ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería y papelería, entre otras (Pardo, 2004). Una de las más claras indicaciones al respecto radia en las enormes ventas anuales de

la industria farmacéutica a causa de la investigación de las diferentes aplicaciones de las **peptidasas en el campo de la salud humana (Barret, 1999).**

Las proteasas pueden ser obtenidas a partir de microorganismos, que tiene la capacidad de producirlas, sin embargo las fuentes de obtención de este tipo de enzimas incluye: animal, vegetal y microbiana. Las investigaciones se han enfocado principalmente en aquellos microorganismos con capacidad de generar grandes cantidades de proteasas o que habiten en ambientes extremos (Ramírez, 2009). Las proteasas de origen microbiano, representan aproximadamente el 40% de las ventas mundiales de enzimas. Además representan una excelente fuente de enzimas, debido a que los microorganismos presentan características favorables para su explotación industrial, tales como una amplia diversidad bioquímica, son susceptibles a manipulación genética, reproducción rápida, entre otras (Rao et al., 1998).

2.1.- Problema

Las enzimas proteolíticas tienen gran importancia biotecnológica ya que se emplean en diversos rubros industriales: la industria farmacéutica, alimentaria, curtiembre de pieles y elaboración de detergentes entre otros (Sharmin & Rhaman, 2007).

En biotecnología la aplicación de enzimas es un área de impacto, específicamente dentro del sector alimentario, farmacéutico y analítico. En nuestro país la producción de enzimas es prácticamente inexistente, por tanto, el mercado venezolano de enzimas se caracteriza por pocos ofertantes para la demanda nacional, lo que provoca altos costos, por ende las empresas que requieren enzimas se ven obligadas a importarlas y depender de la producción externa para suplir sus necesidades (Morillo, 2007).

La problemática nacional de dependencia de importación de enzimas empleadas a nivel industrial genera la necesidad de realizar proyectos de investigación cuyo objetivo principal

sea el aislamiento e identificación de microorganismos productores de dichas enzimas. Por esta razón el Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo” (BIOMI), en conjunto con la Fundación “Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE)”, llevan adelante el proyecto de investigación “Identificación, Selección y Evaluación de Cepas (fúngicas y bacterianas) con Uso Potencial en la Industria Alimentaria”, dentro del que se desarrolla este trabajo bajo el tema “Aislamiento e identificación de microorganismos productores de proteasas termoestables en la región andina de Venezuela”.

Este trabajo evaluará a partir de microorganismos aislados de la zona andina venezolana la producción de enzimas proteolíticas, caracterizando las condiciones necesarias para determinar sus posibles aplicaciones industriales.

2.2.- Hipótesis

Los microorganismos presentan una gran diversidad metabólica, muchos de ellos son potenciales productores de enzimas proteolíticas. “Si se logra aislar e identificar estos microorganismos productores de proteasas, sería posible la caracterización de dicha actividad para su aprovechamiento en la industria”.

2.3.- Objetivos

2.3.1.- Objetivo general

Aislar e identificar microorganismos productores de enzimas proteolíticas de la región andina de Venezuela.

2.3.2.- Objetivos específicos

- Realizar muestreos en ambientes ricos en proteínas ubicados en la región andina de Venezuela.
- Aislar microorganismos a partir de las muestras recolectadas en la región andina de Venezuela.
- Seleccionar los microorganismos que presentan actividad proteolítica.
- Caracterizar la actividad proteolítica del extracto enzimático obtenido a partir del microorganismo que presente mayor actividad, destacando efecto del pH, la temperatura y su estabilidad térmica.
- Obtener preparaciones enzimáticas y determinar las condiciones óptimas para su conservación.
- Ensayar la producción de enzimas proteolíticas secretadas por la cepa en un biorreactor de 1.3 L. utilizando las condiciones determinadas a nivel de Erlenmeyer.
- Purificar parcialmente el extracto crudo enzimático obtenido a partir del cultivo del microorganismo que presente mayor actividad proteolítica.
- Identificar, por técnicas moleculares, el microorganismo mediante el secuenciamiento del ADNr 16S.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

Medios de cultivo

Caldo nutritivo

Composición: peptona 5 g; extracto de levadura 3 g; extracto de malta 3 g; glucosa 10 g; agua destilada c.s.p. 1L.

Medio Skim Milk

Composición:

Solución A: Skim Milk, DIFCO 10 g; agua destilada c.s.p. 100 mL.

Solución B: agar 2 g; agua destilada c.s.p. 100 mL.

Se prepararán por separado las soluciones (A y B), esterilizando durante 15 min a 121 psi. Se dejarán en reposo hasta alcanzar aproximadamente los 45 °C y se mezclarán (Según Baile y Scott, 1970).

Medio Cultivo Modificado

Composición: gelatina nutritiva 30 g; caldo nutritivo 0,8 g; caseína 0,5 g; cloruro de magnesio 0,1 g; glicerol 20 % 1,2 mL; agua destilada c.s.p. 1 L. Se utilizó el medio mínimo empleado por Almas y col., 2009, modificando la sal. Se reemplazó el cloruro de manganeso por cloruro de magnesio.

3.2.- Métodos

3.2.1- Aislamiento y procesamiento de muestras

Algunos de los microorganismos fueron aislados a partir de muestras colectadas de ambientes ricos en proteínas (como estiércol de animales, comida y animales en descomposición) ubicados en el estado Mérida. Otros fueron obtenidos a partir de placas de medios colonizados por contaminantes del ambiente en el Laboratorio Sixto David Rojo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

Cada muestra fue tomada utilizando envases plásticos estériles y se trasladaron al Laboratorio Sixto David Rojo (BIOMI). A 5 g de la muestra se le agregaron 45 mL de agua peptonada estéril (0,1 %), se agito vigorosamente durante 5 min, se homogenizó en licuadora y se filtro.

El filtrado se utilizo para realizar diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} , se realizo siembra por agotamiento de cada dilución en superficie de placas con agar nutritivo. Las diferentes diluciones se incubaron a 37 y 45 °C durante 72 h, con un monitoreo a las 24 h. Transcurrido este tiempo, aquellos microorganismos que crecieron en las placas con agar nutritivo se repicaron por agotamiento en placas con el mismo medio y se incubaron en las condiciones descritas anteriormente teniendo en cuenta la temperatura a la cual fueron aisladas. Luego del crecimiento se almacenaron a 8 °C hasta su uso.

3.2.2.- Rastreo mediante hidrólisis en caseína

Los microorganismos aislados de la muestra fueron sembrados en medio Skim Milk y se incubaron a 45 °C durante 24 h. El criterio de selección de los microorganismos productores de proteasas fue la presencia de una zona clara alrededor de la colonia que corresponde a la hidrólisis de la caseína. Se midió el halo de hidrólisis (zona clara) y las que presentaron mayores diámetros se repicaron en cuñas de agar nutritivo hasta su uso (Baile & Scott, 1970).

3.2.3.- Identificación de la cepa mediante secuenciamiento del ADNr 16S

3.2.3.1.- Extracción de ADN genómico de la cepa en estudio

Se tomo 1 mL de cultivo en caldo nutritivo, y se centrifugó durante siete minutos a 12,000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100 μ L de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl), agregando 3 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubo durante 1 hora a 56 °C en baño María. Posteriormente, se calentó en ebullición durante 10 min y se centrifugo a 12,000 g durante 10 min. Finalmente, se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo, almacenándose a -20 °C.

3.2.3.2.- Detección de ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %

La electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % se realizó en una cámara BIO-RAD Wide Mini-Sub @ cell GT. Utilizando buffer TBE 1 X pH 8,0 (Tris-borato-EDTA); se corrió a 90 voltios durante 30 minutos. Finalizada la separación electroforética, se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 15 min, se lavó con agua destilada y se visualizo en transiluminador White/Ultraviolet.

3.2.3.3.- Amplificación del gen 16S de ADNr de la cepa en estudio por PCR

Se realizó una PCR utilizando los primers universales P₁ (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y P₂ (5'- ATTACCGCGGCTGG-3') que amplifican para 200 pares de bases (Muyzer, 1993). Para la mezcla de reacción se tomaron 5 μ L de buffer Green Go Taq®; 6 μ L de cloruro de magnesio (25mM); 0,6 μ L dNTPs (10mM); 1,2 μ L de P₁ y P₂; 0,6 μ L de Taq; 13,785 μ L de agua destilada. Se mezclaron 2 μ L de la muestra de ADN y 2 μ L de la mezcla de reacción. Se corrió el siguiente programa:

95 °C (3min) →94 °C (1min) →55 °C (1min) →72 °C (1min)→ 72 °C (2min) →4 °C

L 35 Ciclos J

Los productos obtenidos de la PCR se evaluaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 90 voltios durante 30 min.

3.2.3.4.- Purificación final del producto de PCR y secuenciamiento de ADNr de la cepa en estudio

El producto de PCR fue enviado al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para su purificación y posterior secuenciamiento. Finalmente se comparó la secuencia obtenida con las depositadas en las bases de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) y European Bioinformatics institute (EMBL-EBI).

3.2.4.- Caracterización del extracto crudo enzimático (ECE)

3.2.4.1.- Producción de Proteasas

El microorganismo se sembró en un medio de cultivo modificado, el cual contenía 3 % de gelatina de nutrientes, 0,8 % caldo nutritivo, 0,5 % de caseína, 0,01 % MgCl (para reemplazar al MnCl) y 1,2 ml de glicerol al 20 %, se incubó a 45 °C durante 24 - 72 h con agitación constante a 150 rpm (Almas et al., 2009). Después del tiempo de crecimiento, las células se centrifugaron a 25,700 g durante siete minutos y el sobrenadante obtenido se utilizó como el extracto crudo enzimático (ECE).

3.2.4.2.- Precipitación con Acetona

50 mL del ECE se trataron con 200 mL de Acetona a -20 ° C durante 20 min en baño de hielo y se centrifugaron a 25,700 g durante 20 min. El precipitado así obtenido se redisolvió en

siete mililitros de Buffer Tris- HCl 0,1M pH 8,0 y se congelo hasta su uso. En adelante será llamado Extracto Crudo Enzimático Parcialmente Purificado (ECEPP).

3.2.4.3.- Determinación de Proteínas

La determinación de proteínas se realizó utilizando el micrométodo de Bradford. La curva de calibración fue realizada utilizando albúmina bovina (Sigma Chemical Co) como patrón (Pardo, 2004).

3.2.4.4.- Evaluación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó por el método de Pardo (2004). Se tomaron 100 μ L de ECEPP y se mezclaron con 1,1 mL de solución de caseína al 1 % en buffer Tris- HCl 0,1M de pH 8,0 y se incubaron en baño maría durante 10 min a 55 °C. La reacción se detuvo adicionando 1,8 mL de Acido Tricloroacético al 5 % (TCA), se mantuvo a 4 °C durante 20 min, seguido de la centrifugación a 25,700 g durante siete minutos. Al sobrenadante obtenido se le midió la absorbancia a 280 nm. El blanco fue preparado añadiendo el TCA antes de la incubación a 55 °C.

Cada ensayo se realizó por triplicado incluyendo los blancos. Se definió la unidad de actividad caseinolítica (U_{cas}) como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al cabo de un minuto, en las condiciones de ensayo.

3.2.4.5.- Efecto de almacenamiento a bajas temperaturas

Se conservaron ECEPP congelados a -20 °C en alícuotas de 5 mL. Luego de transcurridos 7, 30 y 60 días fueron descongeladas a cada tiempo de conservación, determinándose la actividad residual en cada caso.

3.2.4.6.- Ensayo utilizando inhibidores

250 μ L del ECEPP se mezclaron con 250 μ L de Inhibidores específicos para proteasa serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas (Salvesen y Nagase, 2001). Los inhibidores utilizados fueron: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) 5 mM; Ácido Iodoacético 0.5 mM; Pepstatina A (ácido isovaleril - Val - Val - 4 - amino - 3 - hidroxil - 6 - metilheptanoil - Ala - 4 - amino - 3 - hidroxil - 6 - metilheptanoico) 0,5 mM y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM. La mezcla se incubó durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se determinó la actividad residual. Se realizaron controles negativos por preincubación del extracto crudo enzimático con los solventes usados para disolver cada inhibidor.

3.2.4.7.- pH Óptimo

Se midió la actividad a diferentes valores utilizando buffer Acetato de Sodio 0,1 M (pH: 6,0; 6,5), buffer Tris-HCl 0,1 M (pH: 7,0; 7,5; 8,0), buffer Glicina NaOH 0,1M (pH: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0). Se determinó la actividad caseinolítica máxima.

3.2.4.8.- Temperatura óptima

Para determinar la temperatura que le permita a la enzima manifestar la máxima actividad, se realizó un estudio de actividad a diferentes temperaturas: 20, 37, 45, 55, 65, 75 °C utilizando buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 (Natalucci et al., 1988).

3.2.4.9.- Estabilidad térmica

Se siguió el método de Martin et al., 2005 modificado. Se incubó el ECEPP durante cinco minutos a las siguientes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C y posteriormente se incubó a

4 °C durante 30 min, seguidamente se realizó la determinación de la actividad caseinolítica residual.

3.2.4.10.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica

Se siguió el método empleado por Pardo, 2004. Se incubaron muestras del ECEPP a diferentes valores de fuerza iónica (0; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 mM de NaCl) durante 30 min a temperatura ambiente (se encuentra en 24 ± 2 °C) y luego se ensayo la actividad residual a 55 °C empleando la caseína conteniendo NaCl en la misma concentración que en la incubación previa.

3.2.4.11.- Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática

Para conocer el comportamiento del ECEPP en este sentido, se incubaron muestras del mismo con diferentes concentraciones de EDTA (0,5; 1; 5; 10; 16 mM) durante 10 minutos a 37 °C (Sharmin & Rahman, 2007). Luego se ensayo la actividad caseinolítica residual.

3.2.4.12.- Determinación de los valores de V_{max} y K_m para la enzima en estudio

Se realizaron ensayos con distintas concentraciones de sustrato, en soluciones de caseína en buffer Tris-HCl pH 8,0 en concentraciones de 2, 3, 4 y 5 %. Se midió la absorbancia a 280 nm. Se calcularon los parámetros cinéticos V_{max} y K_m (Hernandez et al., 2004) aplicando el arreglo de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis – Menten.

3.2.4.13.- Ensayo de la Producción de Enzimas Proteolíticas en Biorreactor de 1.3L

El cultivo se llevó a cabo en un biorreactor de 1,3 L de capacidad marca NB (volumen de trabajo 500 mL) durante 24 h, a partir del inóculo en medio caldo de cultivo modificado enriquecido con caseína al 1 %, se tomaron 25 mL para inocular 500 mL de medio contenido en el Biorreactor.

Durante las primeras doce horas, se tomaron muestras cada dos horas, posteriormente cada 4 horas hasta completar las 24 h de crecimiento. De manera estéril se tomaron 4,4 mL para el estudio del crecimiento celular y la producción de enzimas proteolíticas secretadas por el microorganismo. Las condiciones de incubación fueron temperatura a 45 °C, agitación a 100 rpm y aereación de 0,1 vvm. Se monitorizó el pH durante el crecimiento.

3.2.5.- Purificación parcial del Extracto Crudo Enzimático Parcialmente Purificado

3.2.5.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante con Docecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se siguió el método de Laemmli, 1970. Las muestras se prepararon agregando un volumen de buffer de muestra para electroforesis a un volumen de muestra de las fracciones recolectadas de la columna de intercambio catiónico. Para muestras con bajo contenido proteico, se procedió a concentrar la muestra redisolviendo en un volumen de buffer adecuado, de modo tal que la concentración fuese de 5 µg/mL.

Los geles se moldearon empleando el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Se utilizó un gel de apilamiento de 12 % y un gel de espaciador 12 %. Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 µL de capacidad. Se añadieron 3,5 µL para el patrón de peso molecular. En el caso de las muestras, se añadieron 10 µL en cada poso. Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: Myosin B (1974,6 KDa), β-galactosidase (116,5 KDa), Bovine serum albumin (97,2 KDa), Ovoalbumin (50,1 KDa), Carbonic anhydrase (37,6 KDa), Soybean trypsin inhibitor (29,2 kDa), lisozima (20 KDa) y Aprotinin (7,1 kDa). La electroforesis se desarrolló en una celda Miniprotean III (Bio-Rad), a una intensidad de corriente constante de 90 V durante toda la corrida.

3.2.5.2.- Electroforesis en geles con tricina desnaturalizantes (SDS Tricina-PAGE) del ECE parcialmente purificado con acetona

Esta técnica permite una mejor resolución de péptidos de bajo peso molecular (PM). Es un sistema adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 KDa. La tricina es utilizada como ion de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970). Las muestras se prepararon agregando un volumen de buffer de muestra para electroforesis a un volumen de muestra del ECE parcialmente purificado con acetona. Se utilizó un sistema para la resolución de muestras en el rango 5-100 KDa, las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 μ L de capacidad. Se agregaron 2 μ L para los patrones de peso molecular y 5 μ g/mL de la muestra en cada poso. Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: fosforilasa B (97,4 KDa), seroalbúmina (66,2 KDa), ovalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina (21,5 KDa) y lisozima (14,4 KDa). La electroforesis se desarrolló en una celda Miniprotean III (Bio-Rad), a una intensidad de corriente constante de 30 mA durante el apilamiento y 60 mA hasta la finalización de la corrida.

3.2.5.3.- Isoelectroenfoque-Zimograma

El ECEPP con acetona fría a - 20 °C, se centrifugo a 25,700 g durante 15 min, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada. Para llevar a cabo la técnica se utilizó un equipo IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida al 5 % (solución previamente desgasificada durante 20 min) fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo. Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 2,5 μ L para el patrón y 3,5 μ L para las muestras). El rango de anfolitos utilizado corresponde

a 3,5 a 9,3. La corrida se llevó a cabo en tres etapas: 100 V durante los primeros 15 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales (Pardo, 2004).

3.2.5.4.- Cromatografía de intercambio catiónico Columna HiTrap SP HP

Para esta última etapa de purificación se utilizó un equipo FPLC Pharmacia, con una columna SP HP 1,6 × 2,5 cm (5 ml) para intercambio iónico. Equilibrada con buffer bis-Tris-HCl 50 mM de pH 6,0 a 4 °C. El sistema cromatográfico estuvo compuesto por un programador de gradiente adosado a dos bombas para el proceso de elución, un sistema de válvulas para la inyección y control del flujo de volumen, un monitor UV (UV-1) para la medida de absorbancia a 280 nm y otro para la medida de la fuerza iónica, un registrador y un colector de fracciones.

Las condiciones de gradientes empleadas fueron de 0 – 0,25 M, utilizando un intercambiador Cationico fuerte HiTrap SP HP en las separaciones. Durante las corridas realizadas se trabajó con un volumen de muestra de 1 mL y a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min recogiendo fracciones de 1.5 mL. Se determinó la actividad caseinolítica de las fracciones recolectadas, se realizó un Zimograma y se corrió una Electroforesis en geles con tricina desnaturalizantes (SDS Tricina-PAGE) de dichas fracciones para determinar su peso molecular.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- Procesamiento de las muestras y aislamiento de microorganismos

Se aislaron 160 microorganismos en la zona de los Andes Venezolanos (Tabla 3). Después de 24 horas de incubación de los microorganismos aislados, en medio diferencial Agar – caseína, se obtuvieron 24 microorganismos positivos y se seleccionaron 6 microorganismos que desarrollaron mayor halo de hidrólisis (Tabla 4), para finalmente seleccionar la cepa N° 044501 que presentó la mayor actividad caseinolítica que corresponde a 1,44 Ucas/mL y el mayor halo de hidrólisis.

Tabla 3. Muestras a partir de las cuales se aislaron los microorganismos.

Código Microorganismo	Origen de la Muestra	Código Microorganismo	Origen de la muestra
N° 044501	Estiércol de Oveja	N° 123704	Harina de desecho de Camarón
N° 002506	Placa contaminada BIOMI	N° 174501	Excremento de Paloma
N° 023703	Compost, Sector Tabay	N° 174503	Excremento de Paloma
N° 023704	Compost, Sector Tabay	N° 183701	Suelo, Sector Don Perucho
N° 034502	Bosta Bovina	N° 183703	Suelo, Sector Don Perucho
N° 063703	Algas Verdes, Musui (Mucuchíes)	N° 183704	Suelo, Sector Don Perucho
N° 063705	Algas Verdes, Musui (Mucuchíes)	N° 184504	Suelo, Sector Don Perucho
N° 073701	Algas Naranja, Musui (Mucuchíes)	N° 192506	Chicharra Colonizada (BIOMI)
N° 073703	Algas Naranja, Musui (Mucuchíes)	N° 213701	Polilla (Fac. Ciencias)
N° 094501	Algas Grises, Sta Apolonia	N° 234501	Suelo, Municipio Lagunillas
N° 094505	Algas Grises, Sta Apolonia	N° 244501	Suelo, Finca Pedregal (Tucani)
N°104502	Guano de Murciélago	N° 243705	Suelo, Finca Pedregal (Tucani)

Donde: N° 04= Numero de Muestra - 45= Temperatura aislada - 01= Numero de colonia.

Tabla 4. Diámetro de halo de hidrólisis de los microorganismos que presentaron actividad proteolítica (Sánchez et al., 2004).

Código Microorganismo	Diámetro del Halo de hidrólisis (mm)	Capacidad proteolítica (criterio del observador)
N° 044501	ND	+++
N° 094501	19 mm	+++
N° 174501	18 mm	+++
N° 002506	16 mm	+++
N° 234501	15 mm	+++
N° 243705	14 mm	++

+: Capacidad proteolítica baja (≤ 8 mm)

++: Capacidad proteolítica media (> 8 mm / < 15 mm)

+++: Capacidad proteolítica Alta (≥ 15 mm)

ND: No Determinado (Debido a la alta motilidad del microorganismo el halo de hidrólisis fue irregular).

El microorganismo seleccionado fue el que presento mayor tamaño en el halo de hidrólisis, corresponde a la cepa N° 044501(Figura 7), la cual fue aislada a partir de estiércol de oveja, utilizando un medio enriqueció (agar nutritivo). La cepa fue mantenida refrigerada en cuñas que contenían medio agar nutritivo, con repiques cada 2 semanas.

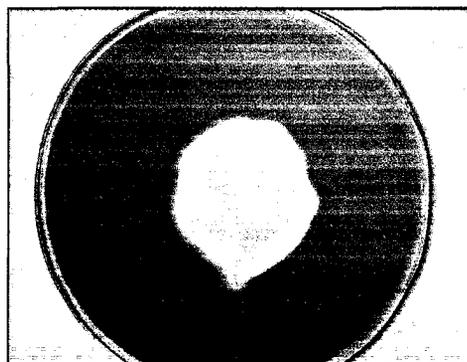


Fig. 7. Halo de hidrólisis producido por enzimas proteolíticas secretadas por la cepa en estudio N° 044501. (Fotografía de los autores).

4.1.1.- Descripción macro morfológica

La descripción macro morfológica del microorganismo se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de la Cepa en estudio N°044501.

Cepa	Características de la colonia de la Cepa en estudio					
N° 044501	Elevación	Borde	Color	Aspecto	Forma	Textura
	Convexa	Irregular y filamentosos	Beige	Áspero	Irregular	Rugosa

4.1.2.- Descripción micro morfológica

Al realizar las observaciones al microscopio óptico de las células coloreadas (Figura 8) y en montaje fresco, se pudo apreciar que la cepa presenta morfología de bacilo Grampositivo de gran tamaño con alta motilidad.



Figura 8. Bacilo Grampositivo Cepa N° 044501. Coloración de Gram (Fotografía de los autores).

4.2.- Identificación molecular de la cepa en estudio

4.2.1.- Extracción de ADN genómico

El procedimiento de extracción de ADN genómico a partir de la cepa fue eficiente (Figura 9), debido a que se observa en el gel la presencia de ADN de la bacteria en estudio. La intensidad de la banda obtenida sugiere que se obtuvo la cantidad de ADN genómico necesario para el proceso de amplificación.

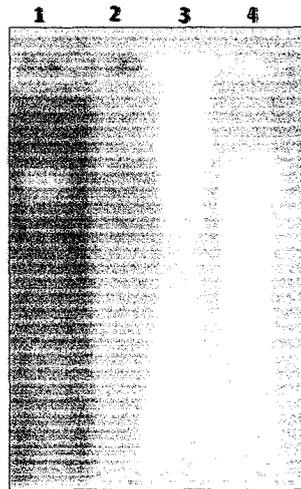


Figura 9. Gel de agarosa al 0.8% mostrando el ADN genómico de la cepa N° 044501. Carril 1: ADN genómico diluido 1/1000. Carril 2: Vacío. Carril 3: ADN genómico concentrado. Carril 4: ADN genómico diluido 1/100.

4.2.2.- Amplificación del gen 16S de ADNr de la cepa

El producto de la PCR (Figura 10) presenta un claro fragmento de la amplificación del gen 16S de ADNr de la cepa, con un tamaño de 200 pb.

www.bdigital.ula.ve

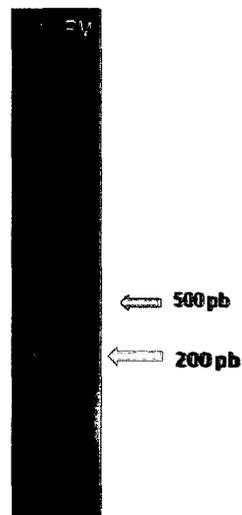


Figura 10. Gel de agarosa al 2% que muestran los resultados de amplificación del gen 16S de ADNr de la Cepa N° 044501. Carril 1: ADN genómico; Carril PM: Escalera de pesos moleculares de 500 pb.

4.2.3.- Análisis de la secuencia de la cepa

La secuencia obtenida se con las depositadas en la base de datos European Bioinformatics institute (EMBL-EBI) y National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se encontró un 100 % de identidad con la bacteria *Bacillus subtilis*. En la Tablas 8 y 9 se observan algunos ejemplos de los resultados de similitud obtenidos para cada base de datos.

Secuencia correspondiente a la cepa N° 044501:
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT.

Tabla 6. Afiliación filogenética de la secuencia de la cepa. (Tomado de la base de datos EMBL-EBI).

Secuencias Relacionadas	% Máximo de Identidad
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i> BEST195 DNA, nearly complete genome.	100
<i>Bacillus subtilis</i> PL-1 having keratinolytic activity and the protease therefrom.	100
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> str. W23, complete genome.	100
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. SMY SMY_ctg6, whole genome shotgun sequence.	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain Z-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone Jia4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100
<i>Bacillus</i> sp. G50II partial 16S rRNA gene, strain G50II	100
<i>Bacillus licheniformis</i> strain CICC10180 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 BS168_ctg1, whole genome shotgun sequence.	99

Tabla 7. Afiliación filogenética de la secuencia de la cepa. (Tomado de la base de datos EMBL-EBI).

Secuencias Relacionadas	% Máximo de Identidad
<i>Bacillus subtilis</i> strain BSP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain THt3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain SRSTH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain MRK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain V90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain TP-Snow-C17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain NB-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain PGPR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain LBK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

Microorganismos como *Bacillus subtilis* subsp. *natto* son de gran importancia en la industria veterinaria que estudios realizados por Sun et al., 2010 demuestra que utilizado como probiótico en terneros de 7 días de edad estimulan el aumento de los niveles de Ig G y de IFN- γ en suero, haciendo viables sus características probióticas, ya que confiere beneficio inmunológico.

4.3.- Caracterización del Extracto Crudo Enzimático

4.3.1.- Electroforesis desnaturalizante del ECE

La electroforesis revela la presencia de cuatro bandas proteicas correspondientes al extracto crudo enzimático (Figura 11), las cuales se encuentran comprendidas de la siguiente manera: la primera en la región de 40 kDa, la segunda 38 kDa, la tercera de un peso molecular de 30 kDa y finalmente una de menor peso molecular que se encuentra alrededor de los 19 kDa.

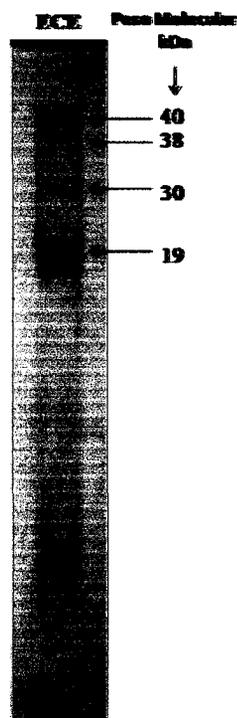


Figura 11. Electroforesis del ECE obtenido a partir de *Bacillus subtilis* en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Carril 1 (ECC): Extracto crudo enzimático.

4.3.2.- Purificación parcial por precipitación con acetona

Antes de realizar la purificación parcial con acetona se realizó una medición de la actividad caseinolítica y de proteínas (Pardo, 2004) obteniendo para el ECE 1,44 Ucas/mL y 1,24 mg/mL. Después de purificar parcialmente utilizando cuatro volúmenes de acetona, se determinaron los mismos valores obteniendo para el extracto crudo enzimático parcialmente purificado (ECEPP) 1,44 Ucas/mL y 1,04 mg/mL. Se observó que mediante la aplicación de la técnica seleccionada para la obtención del ECEPP, pese a perder el 16 % de proteínas totales, se logra mantener el 100 % de la actividad enzimática. Esto indica que el método seleccionado eliminó en un 16 % los restos de compuestos provenientes del medio en el que creció el microorganismo.

La corrida electroforética del ECEPP reveló la presencia de dos bandas con un peso molecular de 29 y 14 kDa (Figura 12). Resultados similares encontró Mustafa et al., 1995, quienes lograron

aislar y caracterizar una subtilisina con peso molecular de ~30 KDa a partir de *Bacillus subtilis* RT-5 después de realizar una purificación parcial. En este caso los autores utilizaron sulfato de amonio al 75%.

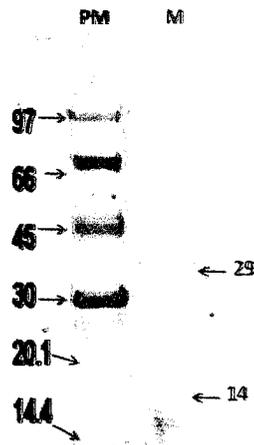


Figura 12. Electroforesis del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis* en geles de poliacrilamida (SDS-Tricine-PAGE). Carril 1: patrón de peso molecular (PM) y carril 2: Extracto crudo enzimático precipitado con Acetona.

4.4.- Evaluación del ECEPP

4.4.1.- Cromatografía de intercambio catiónico (HiTrip SP HP)

Para continuar la purificación el ECEPP se realizó la cromatografía de intercambio Catiónico (HiTrip SP HP). La selección de la estrategia de purificación se basó en los datos obtenidos por Isoelectroenfoco con Zimograma (Figura 13).

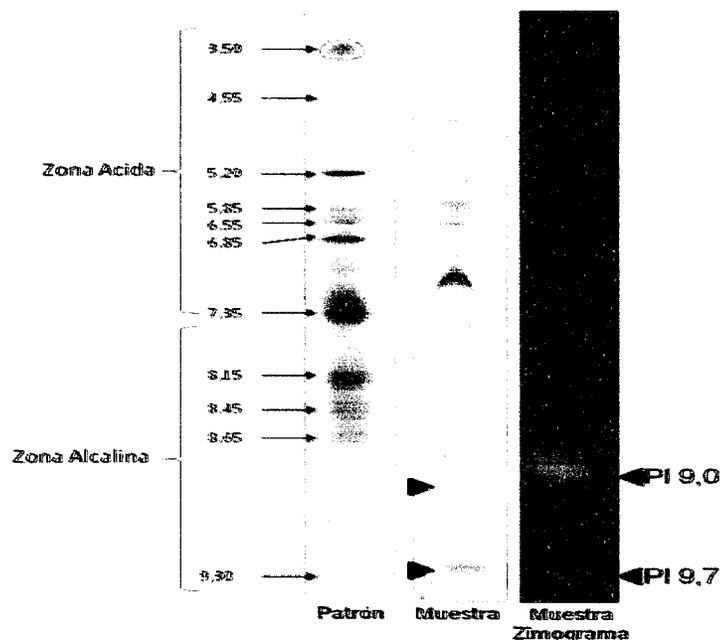


Figura 13. Isoelectroenfoque y Zimograma del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*. 1: Patrones de Punto Isoeléctrico; 2: Extracto crudo enzimático parcialmente purificado; 3. Zimograma: extracto crudo enzimático parcialmente purificado.

Se encontraron dos bandas en la zona alcalina que corresponden a los puntos isoeléctricos de 9,0 y 9,7 (Figura 13), por esta razón se selección la cromatografía de intercambio Catiónico como primer método de separación.

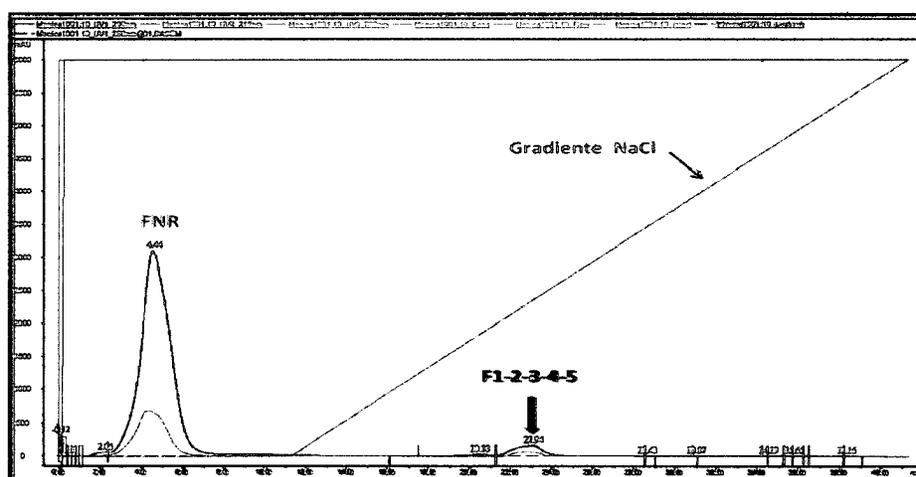


Figura 14. Cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico realizado al ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis* (HiTrip SP HP).

Se obtuvo una fracción no retenida, la cual presento actividad proteolítica demostrada a través del Isoelectroenfoque-Zimograma (Figura 14). La aplicación del gradiente lineal de NaCl 0 – 0,25 M permitió la separación a un gradiente de 0,2 M de NaCl de cinco fracciones que corresponden a un único pico. De las cuales solo presento actividad caseinolítica la fracción número 4, sin embargo al realizar el Isoelectroenfoque-Zimograma se demostró la presencia de hidrólisis del sustrato, lo que sugiere existencia de actividad proteolítica (Figura 15).

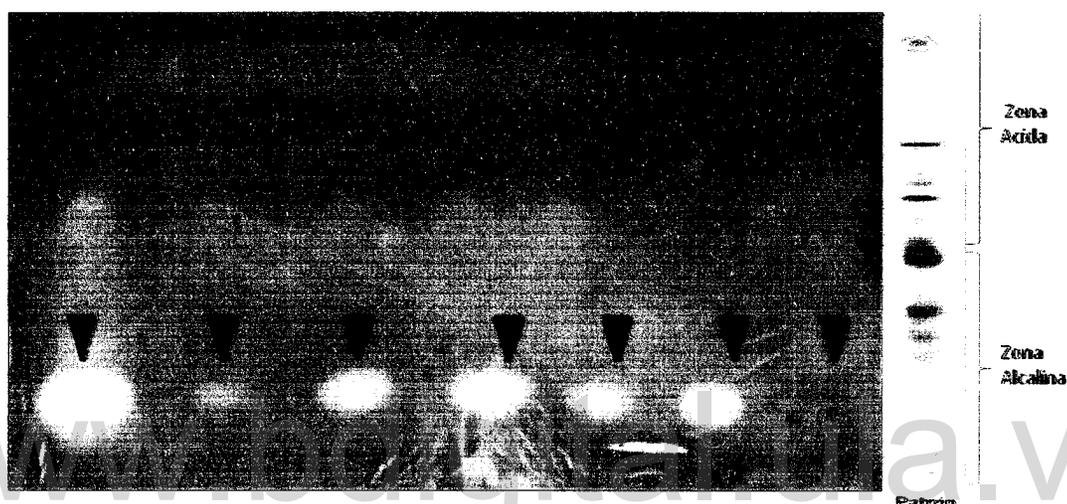


Figura 15. Zimograma de las fracciones obtenidas por Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP) realizada al ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*. M: Muestra; FNR: Fracción No Retenida; F1: Fracción 1; F2: Fracción 2; F3: Fracción 3; F4: Fracción 4; Fracción 5; Patrón: Patrón de Isoelectroenfoque.

En función de los resultados obtenidos se procedió a realizar una SDS-Tricina-PAGE a las fracciones retenidas por Intercambio Catiónico, que destacó la presencia de un polipéptido de 25,4 kDa en las fracciones 4 y 5 (F5) y un polipéptido de 10,8 kDa en la fracción 5, como se observa en la Figura 16. La literatura reporta proteasas alcalinas con pesos moleculares comprendidos entre 16 – 32 kDa (Adimarayana, 2003) para *Bacillus sp.* Un estudio realizado por Almas et al., 2009 reporta la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico de un proteasa alcalina con un peso molecular ~26 kDa proveniente de la cepa *Bacillus SAL 1*.

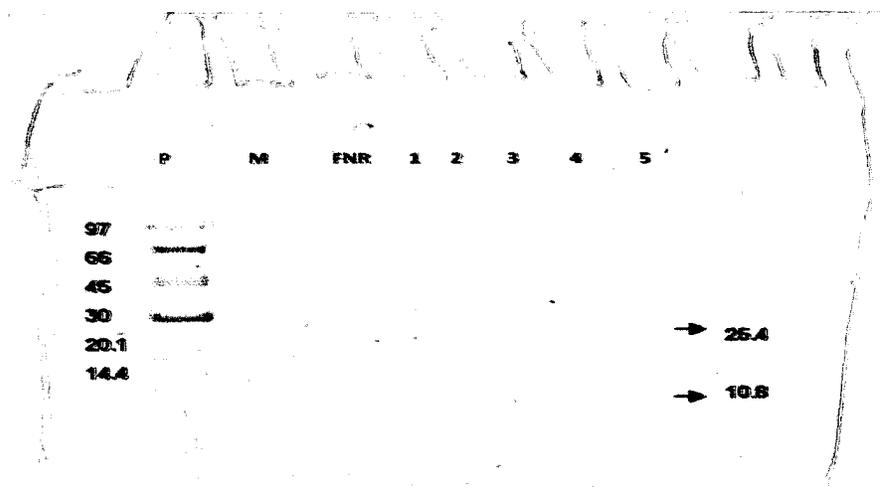


Figura 16. Electroforesis en gels de poliacrilamida (SDS-Tricine- PAGE) realizada a las fracciones obtenidas de la Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP) realizada al ECEPP a partir de *Bacillus subtilis*. Carril 1: patrón de peso molecular (PM) y carril 2: Extracto crudo enzimático precipitado con Acetona; Carril 3: Fracción no retenida; Carril 4: Fracción 1; Carril 5: Fracción 2; Carril 6: Fracción 3; Carril 7: Fracción 4 y Carril 8: Fracción 5.

4.4.2.- Esquema de purificación del ECEPP a partir de una columna de intercambio catiónico (CIC) HiTrip SP HP

En la Tabla 8 se observa que el factor de purificación y el rendimiento obtenido para esta enzima es bajo, Sin embargo la cantidad de enzima pura obtenida a partir de extracto crudo proveniente de cultivo microbiano presenta una actividad proteolítica favorable para la posible utilización de la enzima en diferentes procesos industriales.

Tabla 8. Esquema de purificación del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis* utilizando Cromatografía de Intercambio Catiónico (HiTrip SP HP).

Etapa	Volumen mL	Proteínas mg/ mL	Proteína total mg	Activ. Ucas/ mL	Activ. total Ucas	Activ. esp. Ucas/mg
Extracto Crudo	50	1,24	62	1,44	72	1,16
Precipitado Acetónico	50	1,04	52	1,44	72	1,18
CIC (F5)	1	0,46	0,46	0,276	0,276	6

4.5.- Caracterización del ECEPP

4.5.1.- Efectos del almacenamiento a bajas temperaturas

El ECEPP presento una actividad caseinolítica inicial de 0,307 Ucas/mL en el momento de su obtención y se observó un descenso de la actividad caseinolítica debido al efecto de la congelación, como se aprecia en la Figura 17.

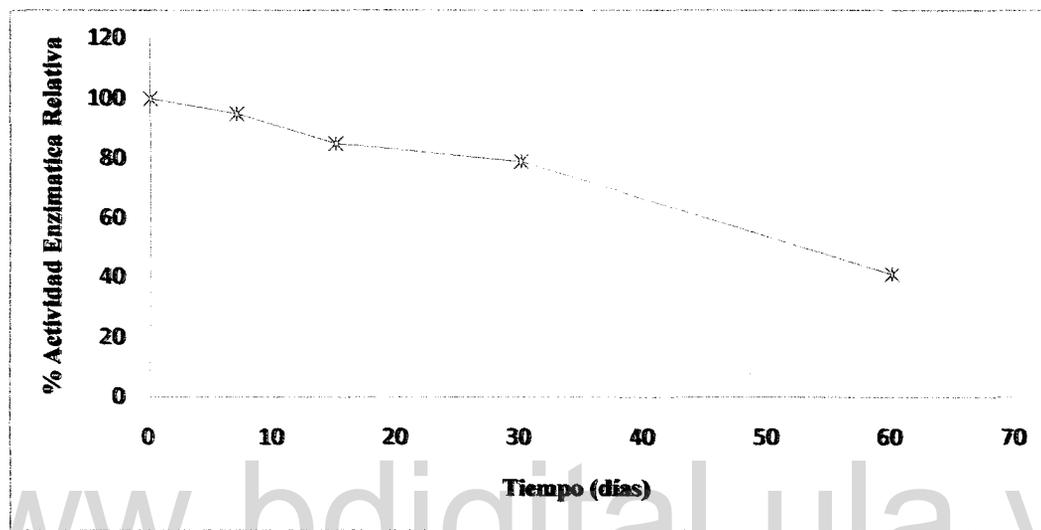


Figura 17. Efectos del almacenamiento a bajas temperaturas para el ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*.

Si bien la disminución inicial de la actividad proteolítica por efecto de la congelación es de 5 %, después de 60 días pierde hasta un 60 % de su actividad. Entre los días siete y treinta descendiendo gradualmente hasta un 21 %. Lo que permite conservar la enzima a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por un mes sin una pérdida significativa de actividad.

4.5.2.- Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

Se observó que la enzima fue inhibida en forma prácticamente total por PMFS y EDTA, inhibidores característicos de proteasas Serínicas y Metaloproteasas respectivamente (Tabla 9). Por otra parte, la Pepstatina A (inhibidor de proteasas Aspárticas) y el Acido Iodoacético

(inhibidor de proteasas Cisteínicas) no presentaron inhibieron significativamente sobre la actividad enzimática.

La totalidad de los resultados precedentes, obtenidos con los inhibidores específicos de grupo, suponen la presencia de Metaloproteasas y proteasas Serínicas que son enzimas inhibidas por estos compuestos. Se infiere que al utilizar EDTA, se secuestra el ion metálico que está involucrado en la catálisis enzimática, desestabilizando las estructuras de las enzimas impidiendo su participación sobre el sustrato proteico.

Tabla 9. Acción de inhibidores sobre la Actividad proteolítica del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis* la enzima.

Inhibidor	Concentración (mM)	% Actividad Residual	Ucas/mL
Acido Iodoacético	0,5	100	0,217
Pepstatina A	0,5	99	0,212
PMFS	5	5	0,010
EDTA	5	8	0,015

4.5.3.- Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática

Con una actividad caseinolítica inicial de 0,83 Ucas/mL, los resultados de este ensayo (Figura 18) indican que la enzima es inhibida por el EDTA, perdiendo el 67 % de su actividad a concentraciones de 0.5 mM de este compuesto (pre incubación con 0.5 mM EDTA). La inhibición de la actividad enzimática aumenta con concentraciones crecientes de EDTA, lo que sugiere que la enzima podría requerir de un ion metálico para desarrollar su actividad. El EDTA actúa como quelante eliminando el ion metálico que se encuentra ubicado cerca del sitio activo de la enzima. Puede predecirse a partir de este resultado la presencia de una enzima metaloproteasa alcalina.

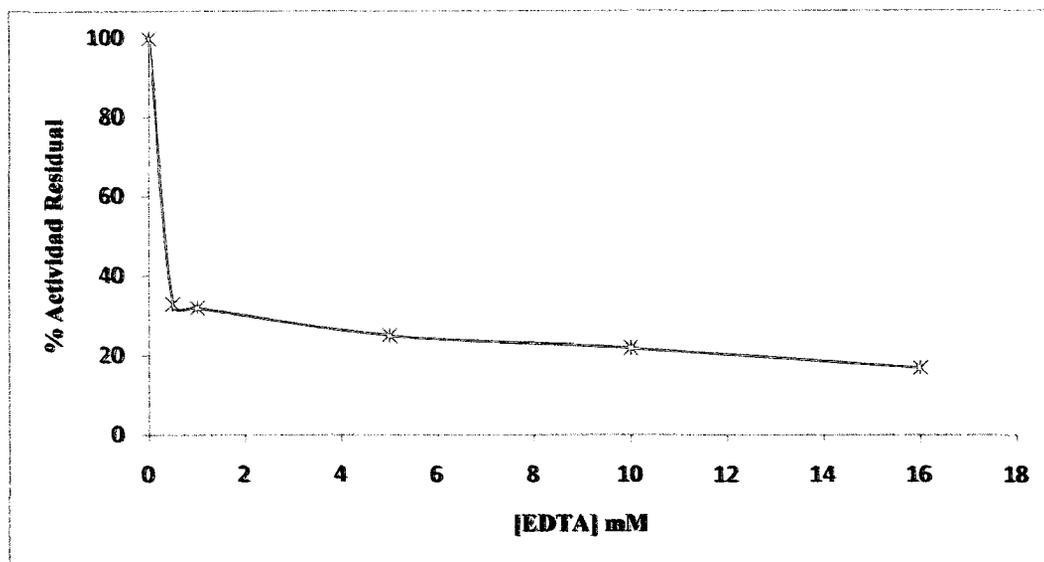


Figura 18. Efectos de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*.

4.5.4.- Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

En la Figura 19 se observan dos máximos, el primero es local y corresponde al valor de pH 7,0. En los primeros estudios realizados a la ureasa, Cifuentes et al., 1981 reportan un pH óptimo de 7,0 para dicha enzima que posee como metal en su sitio activo al níquel. Las proteasas neutras tienen actividad a valores de pH cercano a la neutralidad y en condiciones ácidas su actividad disminuye, en esta clasificación se incluyen las metaloproteasas como la elastasa, proteasa producida por *Pseudomona aeruginosa* con actividad a pH 7,0.

El segundo pico es general y corresponde a pH 9,0 donde se presentó la mayor actividad caseinolítica con 0,561 Ucas/mL. Para este último la literatura refiere que el rango óptimo de pH para proteasas alcalinas se encuentra normalmente entre pH 9,0 a 11,0, proteasas alcalinas de *Bacillus subtilis* PE-11 con similares propiedades han sido reportados por Adinarayana et al. (2003). Estos resultados están de acuerdo con varios informes anteriores que muestran pH óptimos de 9,0 - 10,5 de la proteasa de *Bacillus sp.* por Durham (1987).

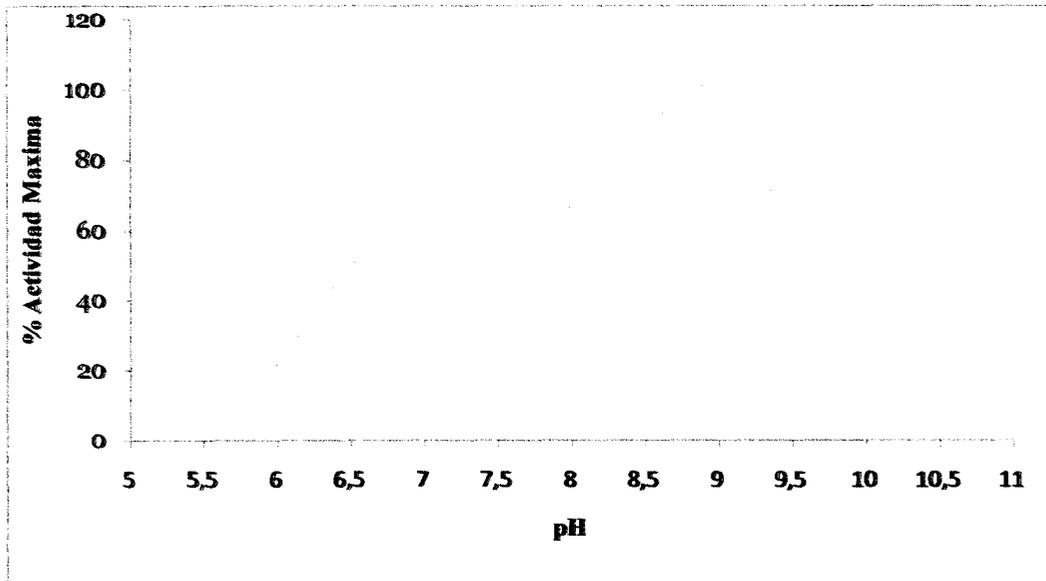


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*.

4.5.5.- Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

Se encontró que la mayor actividad enzimática fue alcanzada a 55 °C como una actividad caseinolítica de 0,299 Ucas/mL (Figura 20), sin embargo no fue estable en su temperatura óptima. Proteasas alcalinas de *Bacillus sp.* con temperaturas óptimas similares han sido reportado por Almas et al., (2009).

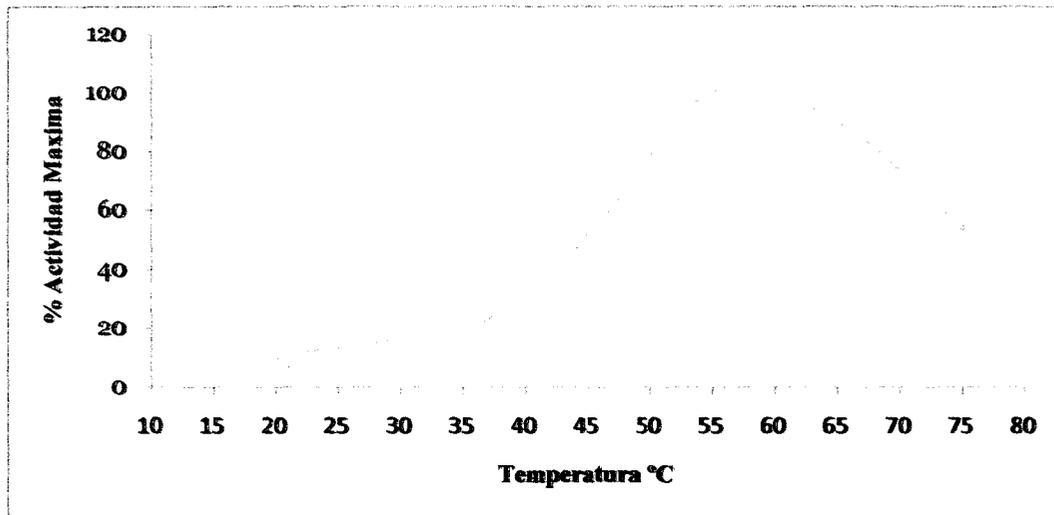


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del ECEPP a partir de *Bacillus subtilis*.

4.5.6.- Estudio de estabilidad térmica

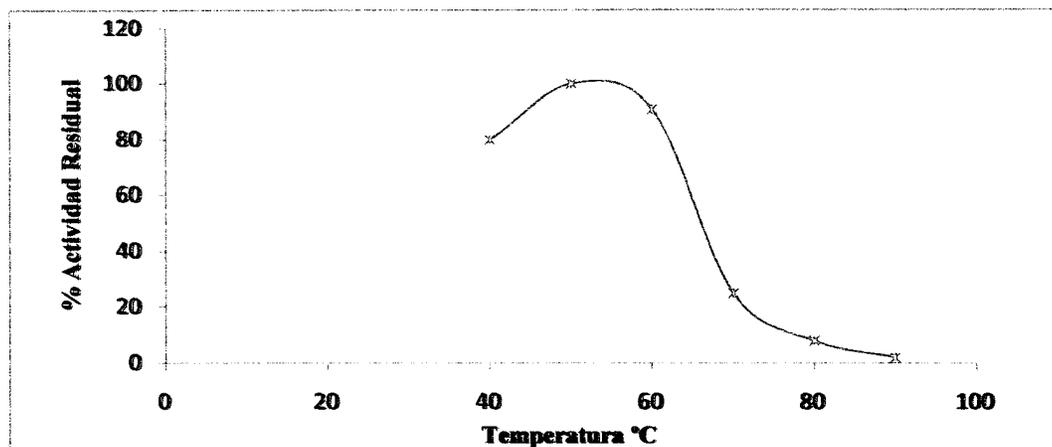


Figura 21. Estabilidad térmica luego de cinco min de incubación a diferentes temperaturas y posterior mantenimiento a 4 °C por 30 min del ECEPP a partir de *Bacillus subtilis*.

Se encontró que la proteasa bajo estudio mantiene una máxima actividad cuando es pretratada cinco minutos a 50 °C, reteniendo el 100 % de su actividad que corresponde a 0,99 Ucas/mL (Figura 21). Sin embargo el porcentaje de estabilidad de la enzima disminuye un solo en un 9 % a 60 °C, lo que hace viable su utilización en procesos industriales a dicha temperatura. Por encima de 60 °C, el aumento de velocidad de la reacción que puede darse debido al incremento de la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica causada por la desnaturalización térmica y como consecuencia la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

4.5.7.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica

La enzima presentó una actividad caseinolítica inicial de 0,94 Ucas/mL. El ensayo evidenció una fuerte disminución en la actividad caseinolítica después de ser incubada con una solución NaCl 62,5 mM, manteniendo solo el 58 % de su actividad (Figura 22). Este porcentaje fue disminuyendo progresivamente hasta presentar la mínima actividad proteolítica cuando la enzima fue incubada con una solución de NaCl 1000 mM; puede suponerse que a la citada

concentración salina se produce un cambio conformacional de la enzima, lo que provoca una modificación en su capacidad catalítica. Por otra parte, no se descarta que este comportamiento se deba a la presencia de dos tipos de enzimas, aspecto que se evidencia en el ensayo con inhibidores. Pese a que a valores moderados de fuerza iónica perdió el 42 % de su actividad, permaneció estable a medida que aumentaban la concentración de NaCl. Si bien la actividad de la mayoría de las enzimas es poco afectada a valores bajos de fuerza iónica, la misma suele disminuir cuando la concentración de sal se incrementa por encima de 200 mM (Scopes, 1984).

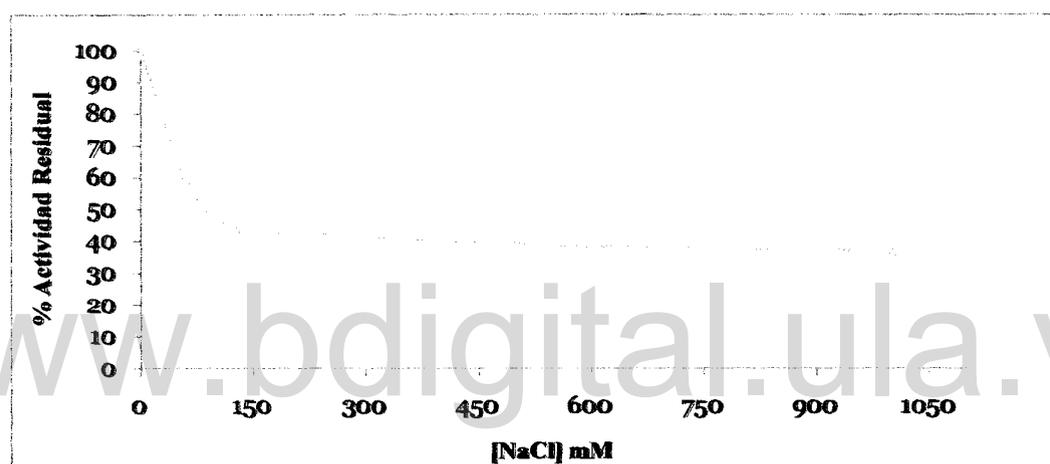


Figura 22. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática del ECEPP obtenido a partir de *Bacillus subtilis*.

4.5.8.- Valores de V_{max} y K_M para la enzima en estudio

En cuanto a la caracterización cinética la enzima en estudio presentó un comportamiento michaeliano con parámetros cinéticos $V_{max} = 0,046$ Ucas/min y $K_M = 0,192$ mM/mL. El valor de K_M obtenido es menor a la unidad, con lo que se concluye que la enzima tiene afinidad aceptable por el sustrato.

4.6.- Ensayo de la producción de enzimas proteolíticas en un Biorreactor de 1.3 L

Los resultados del ensayo de la producción de enzimas proteolíticas en medio mínimo enriquecido con caseína al 5 % en un biorreactor de 1,3 L se presentan en la Figura 23.

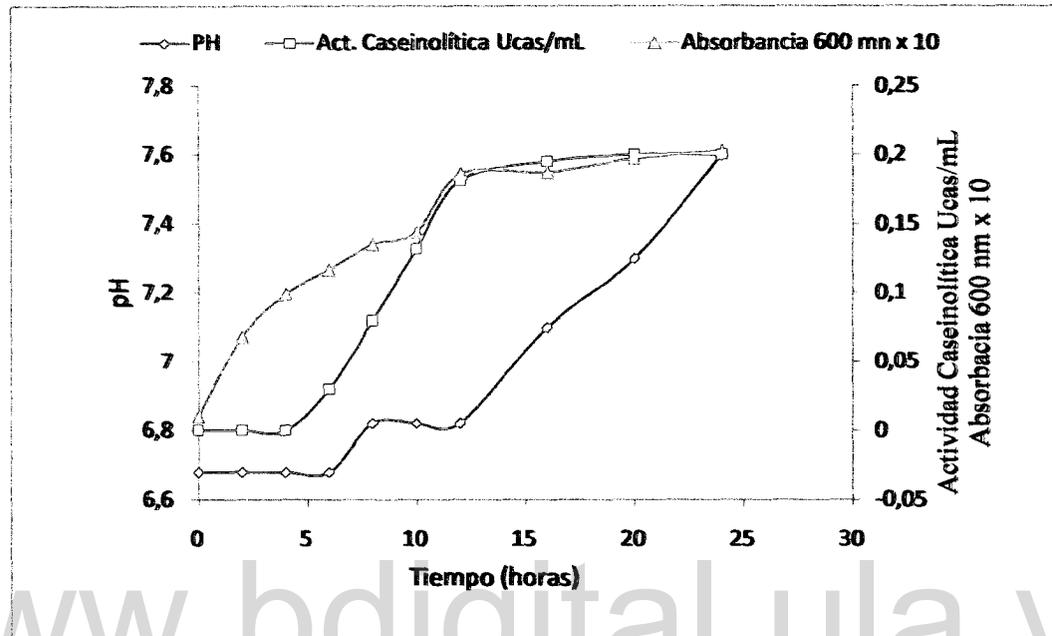


Figura 23. Ensayo de la producción de enzimas proteolíticas a partir de *Bacillus subtilis* en medio caldo modificado enriquecido con caseína al 0.5 % en un Biorreactor de 1,3 L.

Los resultados obtenidos revelan que la producción enzimática está asociada al crecimiento celular. Pese a que en las 4 primeras horas no se detectó actividad, esta aumentó gradualmente durante la fase exponencial y se mantuvo estable durante la fase estacionaria. Por otra parte, mediciones de pH en el cultivo realizado en el biorreactor muestran que el cultivo se inicia con un pH cercano a la neutralidad 6,68 y durante las primeras cuatro horas el pH es constante, este periodo coincide con la ausencia de producción de la enzima. A partir de las cuatro horas, se inicia un aumento gradual en los valores de pH y actividad, periodo que coincide con el desarrollo de la fase exponencial.

De acuerdo a estos resultados se podría decir que la producción de enzimas proteolíticas se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento celular. En las condiciones de ensayo el pH aumento solo una unidad, la cual se mantuvo en un valor cercano a la neutralidad.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

- Se aisló e identifico satisfactoriamente una cepa de *Bacillus subtilis* con actividad proteolítica destacada en la región andina de Venezuela.
- Se realizó un muestreo en la región andina de Venezuela, logrando aislar a partir de ambientes ricos en proteínas 160 microorganismos de los cuales 24 presentaron actividad proteolítica positiva a la prueba de hidrólisis en caseína. Seleccionando los 6 microorganismo con mayor tamaño de halo, para finalmente seleccionar la cepa N°044501 aislada a partir de estiércol de oveja e identificada por técnicas moleculares como *Bacillus subtilis*.
- Se identifico la cepa en estudio como *Bacillus subtilis*. Al ser coteja con la base de datos EMBL-EB se encontró 100 % de identidad con *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, microorganismo de gran importancia a nivel de la industria veterinaria por su utilización como probiótico en ganado bovino, por esta razón se recomienda realizar estudios que revelen si el microorganismo confiere beneficio inmunológico haciendo viable su utilización como probiótico.
- El tratamiento del extracto crudo enzimático con inhibidores específicos de grupo supone la presencia de Metaloproteasas y proteasas Serínicas. Este tipo de proteasas, principalmente neutras y alcalinas son producidas por bacterias del genero *Bacillus*.
- El perfil de pH de la muestra en estudio, exhibe una elevada actividad en un rango de pH amplio que va entre 7.0 y 10.0, con un valor óptimo aparente de 9.0. En cuanto a la estabilidad a la fuerza iónica, pese a que a valores moderados de fuerza iónica perdió el 42% de su actividad, presento mayor estabilidad a medida que aumentaban la concentración de NaCl. La estabilidad térmica fue buena, reteniendo el 100% de su actividad luego de haber sido incubada 5 minutos a 50°C. La enzima puede ser inactivada casi por completo al someterse a calentamiento a 90°C durante 5 minutos.

El conocimiento obtenido de la caracterización del extracto crudo enzimático producido a partir del cultivo de *Bacillus subtilis* es fundamental para la posible utilización de la enzima en diferentes procesos industriales.

- Se obtuvieron preparaciones enzimáticas, determinando que las condiciones óptimas de conservación de la enzima son a - 20 °C hasta por un mes sin una pérdida significativa de actividad.
- El cultivo en el biorreactor mostró que la producción de enzimas proteolíticas por parte de *Bacillus subtilis* se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento celular, manteniendo, en las condiciones de ensayo un pH cercano a la neutralidad. La actividad proteolítica aumentó gradualmente durante la fase exponencial y se mantuvo estable durante la fase estacionaria, confirmando lo anteriormente expuesto.
- Por precipitación con acetona se pudo obtener un extracto parcialmente purificado, que retiene el 100% de la actividad enzimática a pesar de que se pierde el 16 % de la concentración de proteínas.
- La electroforesis SDS-PAGE y SDS-Tricine-PAGE, revelaron bandas proteicas que se encuentran entre 14 y 40 kDa, con predominio de dos bandas de peso molecular de ~14 y ~29 kDa en el ECEPP. Valores que son del mismo orden a los expuestos por las serinproteasas estudiadas en microorganismos aislados de diferentes ambientes.
- El Isoelectroenfoque determinó la presencia de dos bandas activas que corresponden a los puntos isoeléctricos de 9.0 y 9.7 por esta razón se seleccionó la cromatografía de intercambio Catiónico como primer método de separación.
- La purificación parcial de las proteínas contenidas en el extracto crudo se logró mediante la cromatografía de intercambio Catiónico. Por este método cromatográfico se obtuvo una fracción no retenida constituida por una única banda que presenta una pequeña actividad proteolítica. La aplicación de un gradiente lineal entre 0 – 0.3 M

permitió la separación de otras fracciones importantes dentro de las que se destacan dos bandas con pesos moleculares de ~10 y ~25 kDa, característicos de serínproteasas estudiadas.

- Las propiedades que posee la enzima en estudio tales como exhibir elevada actividad proteolítica a un amplio rango de pH, una elevada temperatura y presentando estabilidad térmica; son fundamentales para la posible utilización de la enzima en diferentes procesos industriales.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFÍA

Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. (2003). Purification and characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Pharm. Sci. Technol.* 4(4): 1-9.

Akbalik G., (2003). “Screening for industrially important extracellular enzymes from alkalophilic *Bacillus* genus” İzmir Institute of Technology, Biotechnology Department, İzmir, 2003.

Almas, S., Hameed, A., Shelly, D., and Mohan, P. (2009). Purification and characterization of a novel protease from *Bacillus* strain SAL 1. Department of Microbiology, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320, Pakistan. Department of Chemistry and Biochemistry, Texas Tech University, Lubbock, Texas, 79409, USA.

Anwar A & Saleemuddin M, (1998). “Alkaline proteases: a review” *Bioresource Technology*, 64, 175.

Argos, P. (1987). A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 193:385–396.

Avakov, A. S., A. P. Bolotin, and S. V. Sorokin. (1990). The structure of *Bacillus brevis* metalloprotease gene. *Mol. Biol.* 24:1363–1372.

Baile, R. and Scott, E. (1970). *Diagnostic Microbiology*. 3^a Edition. Editorial Mosby. Toronto. Pp. 334.

Barret, A. J. (1999). “Peptidases: a view of classification and nomenclature”, en “Proteases: a new perspective”, (V. Turk, ed). Ed. Brikhäuser Verlag Basel, Switzerland. (pág. 1-12).

Boyer, P. D. (1971). *The enzymes*, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

Chaplin M and Bucke C, (1990). “The large-scale use of enzymes in solution”, In *Enzyme Technology*, edited by M. Chaplin and C. Bucke, (Cambridge University Press).

Chiplonkar, J. M., S. V. Gangodkar, U. V. Wagh, G. D. Ghadge, M. V. Rele, and M. C. Srinivasan. (1985). Applications of alkaline protease from *Conidiobolus* in animal cell culture. *Biotechnol. Lett.* 7:665–668.

Cifuentes, B., Estevez, M. P. and Vicente, C , (1981). *In vivo* protection of urease of *Evernia prunastri* by dithiothreitol. *Physiologia Plantarum* 53, 245-8.

Cowan D.A, (1994). “Industrial Enzymes”, In *Biotechnology-The science and the business*, edited by V. Moses and R.E. Cape, (Harwood Academic Publishers, Switzerland), pp.326-328.

Daley P.G, (1994). “Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate” *Bioresource Technology*, 48, 265.

Daniel CS, Kopec LK, Yasbein RE, Young EF (1984). Characterization of *Bacillus subtilis* DSM 704 AND its production of 1-Deoxynojirimycin. *Appl. Environ. Microbiol.* 281: 280-284.

Durham, D.R. (1987). Utility of subtilisin GX as a detergent additive. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 381-86.

Gençkal, H. (2004). Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. Department: Biotechnology and Bioengineering İzmir Institute of Technology İzmir, Turkey.

Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe B.A, and Mattiasson B, (2003). “Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather” *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 519.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut , K., Chukeatirote, E., and Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand. Department of Biotechnology, School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100 Thailand.

Goizt, I. (2006). Proteases i inhibidors com a models per a estudis de relació estructura-funció I agregació. Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica. Universidad Autónoma de Barcelona.

Gupta R, Beg Q.K, Khan S and Chauhan B, (2002). “An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 381.

Hartley, B. S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29:45–72.

Hernandez, M., Hernandez, F., Reboloso, O., Lliná, A., Ruelas, X., (2004). Protease obtaintion and characterization with application in cheese industry using cardo (*Cynara cardunculus L.*) Universidad Autonoma de Coahuila.

Horikoshi K, (1996). “Alkaliphiles – from an industrial point of view” *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 259.

Jenny A.J., (1999). “Nomenclature and Classes of Peptidases”, In *Proteolytic Enzymes Tools and Targets*, edited by E.E. Sterchi and W. Stöcker, (Springer-Verlag, Germany), pp. 1-8.

Johnvesly B & Naik G.R, (2001). “Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium” *Process Biochemistry*, 37, 139.

Kim S.S, Kim Y.J, and Rhee I, (2001). “Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674” *Archives in Microbiology*, 175, 458.

Kudrya V.A and Simonenko I.A, (1994). “Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 505.

Kumar C.G & Takagi H, (1999). “Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint” *Biotechnology Advances*, 17, 561.

Labbe, J. P., P. Rebegrotte, and M. Turpine. (1974). Demonstrating extra-VOL. 62, MICROBIAL PROTEASES 631 cellular leucine aminopeptidase (EC 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. C. R. Acad. Sci. (Paris) 278D:2699.

Laemmli, U.K. (1970). “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature* 227: 680-5.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1999). *Principles of Biochemistry*. 3^a Edition. Worth Publishers. Madison. Pp. 99, 213 – 219, 357.

Martin, J. A., Murphy, R. A. and Power, R.F.G. (2005). Purification and physico-chemical characterisation of genetically modified phytases expressed in *Aspergillus awamori*. *Bioresource Technology* 97 1703–1708.

Mala B, Rao A.M. and Deshpande VV (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.

Morillo, M. A. (2007). Análisis del Mercado Venezolano de Enzimas destinadas a la Industria Alimentaria. División de Cereales y Oleaginosas. Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial. San Felipe.

Muyzer, g., De Waal, e. And Uitierlinden, A. (1992). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Department of Chemistry, Leiden University and INGENY, B. V., The Netherlands.

Mustafa, K., Jan-Olov, H., Rudolf, K., Jawed, S., Tashmeem, R., Zafar, H., Hans, J. (1995). Isolation, characterization and structure of subtilisin from a thermostable *Bacillus subtilis* isolate. Department of Microbiology and bHEJ Research Institute of Chemistry, University of Karachi Karachi 75270, Pakistan. Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden.

Muzziotti, D. (2008). Selección de Microorganismos Productores de Enzimas Proteolíticas. Tesis para optar al título de Licenciada en Biología, Universidad de Los Andes. Mérida.

Natalucci, C.L., Brullo, Priolo, N.S., A., Caffini., N.O. and Lopez, L.M.I. (1988). “Proteasas de Bromeliaceae V. Separación y purificación de sulfhidrilproteasas de frutos de *Bromelia balansae* Mez”, *Acta Farm. Bonaerense* 7: 179-85.

Pardo, M.F. (2004). Endopeptidasas de *Bromelia balansae* Mez y su Aplicación en la Modificación de Proteínas Alimentarias. Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Perea A, Ugalde U, Rodriguez I., and Serra J.L, (1993). “Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes” *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 418.

Pérez-Victoria, I. (2006). Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. Tesis para optar al título de Doctor del Departamento de Química Orgánica. Universidad de Granada.

Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. y Heller, H.C. (2004). Vida. La ciencia de la Biología. 6ª Edición. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp. 35, 230, 893.

Ramírez, Y. (2009). Estudio de la producción de enzimas proteolíticas secretadas por *Micrococcus luteus* cepa MBIOMI18 en medios no convencionales. Tesis para optar al título de Licenciada en Biología, Universidad de Los Andes. Mérida.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597 – 635.

Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205–218.

Razo, M.R., Belmán, Barboza, J.E., Salcedo, R., Vázquez, M. and Basurto, M.G. (2008). Producción de Proteasas y Bacteriocinas por la Cepa Mexicana *Bacillus subtilis* No. 21 Contra Hongos y Bacterias Patógenas en Alimentos. Departamento de Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Km 9 Carretera Irapuato-Silao, Exhacienda El Copal S/N Irapuato, Gto.

Reisner, W. (1981). *Röhm Spektrum*, 27: 48, “Industrial enzymes and their applications. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., NY, Toronto, pág. 2.

Rebecca B.D, Pena-Vera M.T., and Diaz Castaneda M. (1991). “Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases, yield and nutritional value” *Journal of Food Science*, 56, 309.

Saeki Katsuhisa S, Katsuya O, Tohru K and Susumu I (2007). Detergent Alkaline Proteases: Enzymatic Properties, Genes, and Crystal Structures. *J Biosci Bioeng.* 103: 501-508.

Salvesen, G., and Nagase (2001). “Inhibition of proteolytic enzymes”, en “Proteolytic enzymes, a practical approach”, 2ª. Ed. (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.) Oxford University Press, Oxford, págs. 105-30.

Sánchez, T., León, J., Woolcott, J. and Arauco K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Rev. Perú Biol. V.11 N.2.

Schallmeyer M, Singh A and Ward OP (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.* 50: 1-17.

Schechter, I. and Berger, A. (1967). “on the size of the active site in proteases”, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 27: 157 – 62).

Scopes, R. K. (1984). “Protein purification. Principles and practice”, Springer – Verlag, N. Y., pág. 219.

Sharmin, F. and Rahman M. (2007). “Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* strain FS-1”. *Agricultural Engineering Internations: the CIGR E-journal.* Vol. IX.

Stoll, E., H. G. Weder, and H. Zuber. (1976). Aminopeptidase II from *Bacillus sterothrophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 438:212–220.

Stryer, L., Tymoczko, J., and Berger, J. (2001). *Biochemistry.* 5th Edition. W.H. Freeman and Company. New York. Pp. 132, 357 – 370.

Sun, P., Wang, J.Q. and H.T. Zhang (2010). Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. State Key Laboratory of Animal

Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, P. R. China.

Torres G.L.I., Basurto C.M.G. (2000). Control Biológico De Hongos Fitopatógenos De La Raíz y Corona De Fresa Con Cepas Antagónicas De *Bacillus subtilis*. Tesis de Licenciatura. ICA. U. de Guanajuato. Irapuato, Gto. México.

Uhlig, H. (1998). Industrial enzymes and their applications. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., NY, Toronto, pág. 1-6; 146-51.

Ward, O. P. (1983). Proteinases, *In* W. M. Fogarty (ed.), Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers, London, England. p. 251–305.

www.bdigital.ula.ve