

# *Universidad Nacional de La Plata*



*Facultad de Ciencias Exactas*

*Departamento de Química*

*Tesis doctoral*

*“Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y  
caracterización”*

*Bca. Ivana A. Cavello*

*Tesista*

*Dr. Sebastián F. Cavalitto*

*Director*

*Año 2013*

*“Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización”*

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

**Tesista:** Bqa. Ivana A. Cavello

**Director:** Dr. Sebastián F. Cavalitto

*A mamá, Yesica, Cristian, Lucas y Mayra*

*A Tato...*

## ***Agradecimientos***

*Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales y a su Director por haberme permitido realizar este trabajo de investigación.*

*A la Universidad Nacional de La Plata por la formación académica brindada*

*A mis Directores de beca, Ing. Carlos Cantera y Dr. Roque Hours por su apoyo y dirección, por el estímulo e interés y por la confianza depositada en mí.*

*A mi Director de Tesis, Dr. Sebastián Cavalitto por su dedicación, estímulo, confianza y enseñanzas.*

*Al Dr. Juan Carlos Contreras-Esquivel, por abrir las puertas de su laboratorio y hacerme sentir como en casa.*

*Al Personal del CINDEFI, Investigadores, Técnicos y Becarios, por su colaboración diaria y apoyo, por las charlas de pasillo y los 21 de setiembre.*

*A Flavia y su equipo (Galle, Mari y Pame) por estar siempre dispuestos a darme una mano de manera desinteresada.*

*A mis compañeros de laboratorio, Lore, Cris, Tere, Leo, Andre y Caty por su ayuda, amistad y por la alegría que le ponen a esas largas horas de laboratorio.*

*A Betina y Cecilia, por ser quienes guiaron mis primeros pasos en el ambiente científico.*

*A Mari, Juancho, Dante, Yani, Ger y el Pela por estar en los buenos y en los malos momentos brindando su apoyo.*

*A Dani, Paz y Ani... "las chicas de Ingles" por los debates morales de la vida, por estar siempre tan en desacuerdo en todo y seguir firmes en la amistad.*

*A mi familia. Sin ella no hubiera llegado hasta aca.*

*A Lucas por tanto divague junto. Te extraño.*

*A May por estar siempre brindándome una sonrisa y enseñarme día a día que con una sonrisa las cosas se ven de otra manera.*

*A Tato, por estar y ser incondicional siempre. Por ser el refugio en los momentos de tempestad.*

*A todos y cada uno de ustedes porque cuando los miro me encuentro y veo lo que fui, lo que soy y lo que quiero ser...*

*Infinitas Gracias*

*“Algunas veces la vida te va a golpear en la cabeza con un ladrillo. No pierdas la fe. Estoy convencido de que lo único que me mantuvo en marcha fue que amaba lo que hacía. Tienes que encontrar lo que amas, y eso es tan cierto para el trabajo como para vuestros amantes. Tu trabajo va a ocupar gran parte de tu vida, y la única manera de estar realmente satisfecho es haciendo lo que crees que es un gran trabajo, y la única manera de hacer un gran trabajo es amando lo que haces. Si no lo has encontrado aún, sigue buscando, no te conformes. Como en todos los asuntos del corazón, lo sabrás cuando lo encuentres, y como en cualquier gran relación, las cosas se pondrán mejor y mejor conforme pasen los años. Así que sigue buscando. No te conformes.”*

*Steve Jobs (Discurso en la Universidad de Standford, 2005)*

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

- “Alternatives Technologies for adding value to bovine hair waste”. Galarza, B., Cavello, I., Greco, C., Hours, R., Schuldt, M, and Cantera, C. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists* (2010), vol 94, (1), 26-32. ISSN 0144-0322.

- “Biodegradation of a keratin waste and the concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*”. Cavello, I., Cavalitto, S., Hours, R. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2012), vol 167, (5), 945-958. ISSN 0273-2289.

- “Evaluation of increase at the production of keratinolytics enzymes” Galarza, B.; Cavello, I.; Garro, L.; Gortari, C.; Hours, R.; Cantera, C. *Journal of aqeic* (2012), vol 63, (3), 70-74. ISSN 0365-5873.

- “Bioprocessing of “Hair Waste” by *Paecilomyces lilacinus* as a Source of a Bleach-Stable, Alkaline, and Thermostable Keratinase with Potential Application as a Laundry Detergent Additive: Characterization and Wash Performance Analysis”. Cavello, I., Hours, R. and Cavalitto, S. *Biotechnology Research International* (2012), vol. 2012, Article ID 369308, 12 pages, (2012). ISSN 2090-3146. doi:10.1155/2012/369308.

- “Aportes para la degradación biológica de residuos sólidos de curtiembre”. Cavello, I. ; Galarza, B.; Hours, R.; Cavalitto, S.; Cantera, C. *LederPiel* (2013), año XVII, (91), 39-45 ISNN 2171-4827.

- “Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment”. Martinez, Y.; Cavello, I.; Hours, R.; Cavalitto, S.; Castro, G. *Bioresource Technology* (2013), vol 145, 280-284. ISNN 0960-8524.

- “Study of the production of alkaline keratinases in submerged cultures as an alternative for solid waste treatment generated in leather technology”. Cavello, I.; Chesini, M.; Hours, R.; Cavalitto, S. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (2013), vol 23, (7), 982-992. ISNN 1017-7825.

- “Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876”. Cavello I.; Hours, R.; Cavalitto, S. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (2013), vol 23, (8), 1133-1139. ISNN 1017-7825.

- "Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. Cavello, I.; Hours, R.; Rojas, L.; Cavalitto, S. Process Biochemistry (2013), vol 48, (5-6), 972-978. ISSN 1359-5113.

- "Optimization of keratinolytic protease production by *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 as a sustainable management of tannery hair waste". Cavello, I.; Cavalitto, S. The Journal of the American Leather Chemists Association (2013), vol 108, 300-310. ISSN 0002-9726.

Pasantías en el exterior:

- Los resultados del capítulo 7: Inmovilización de una queratinasa de *P. lilacinum* sobre esferas de quitosán presentados en este trabajo de Tesis han sido obtenidos en el marco de una pasantía realizada en la Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Cs Qcas. Departamento de Investigación en Alimentos, bajo la denominación de capacitación personal en "Inmovilización de proteasas en esferas de quitosán-genipina" en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos. Bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel. Noviembre-Diciembre 2011. Saltillo, Coahuila, México.



# *Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y*

## *caracterización*

### **Resumen**

Actualmente las proteasas alcalinas son ampliamente utilizadas en la industria del cuero, en distintas formulaciones de detergentes, también en el proceso de recuperación de plata, y en la producción de hidrolizados de proteínas. Comúnmente, todas estas proteasas se obtienen de fuentes microbianas que crecen en sustrato relativamente caros. Muchos estudios demuestran que cerca del 40 % del costo de producción de estas enzimas está relacionada con la composición del medio de cultivo. Para reducir el costo de producción es importante la búsqueda de microorganismos capaces de crecer y de producir suficiente cantidad de la enzima usando sustratos baratos. En este sentido desechos de naturaleza queratínica tienen un enorme potencial para ser utilizados como sustrato para la producción de un grupo de enzimas proteolíticas llamado *queratinasas*, las cuales presentan la capacidad de hidrolizar la queratina, proteína sumamente resistente a la degradación por su estructura y por la presencia en su molécula de puentes disulfuro. En el presente trabajo de tesis seis cepas de hongos no patógenos aislados de suelos alcalinos de la provincia de Buenos Aires, Argentina, (*Acremonium murorum*, *Aspergillus sidowii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Neurospora tetrasperma*, *Purpureocillium lilacinum* (ex *Paecilomyces lilacinus*) y *Westerdikella dispersa*) fueron evaluados de acuerdo a su capacidad de producir enzimas queratinolíticas. Entre estas cepas, *P. lilacinum* resultó ser el hongo con mayor producción de actividad proteolítica y queratinolítica, tanto en fermentación en sustrato sólido como en sumergido, siendo seleccionado para continuar con este trabajo. Se establecieron las condiciones óptimas de cultivo para la producción enzimática utilizando diseños experimentales y la metodología de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas fueron: 7.10 g/l de glucosa; 0.0065 mg/l de CaCl<sub>2</sub> y pH inicial de 5.60; en estas condiciones de cultivo, el rendimiento máximo para la producción de queratinasas predijo por el modelo fue de 26.7 U azo/ml. La validación del modelo demostró que tanto el polinomio como las correspondientes superficies de respuesta

obtenidas describen adecuadamente la influencia de la concentración de glucosa, de calcio y el pH inicial en la producción de queratinasas. Luego de la optimización del medio de cultivo se procedió a la purificación de la enzima, las etapas involucradas en la purificación fueron la precipitación con sulfato de amonio y distintas técnicas cromatográficas de intercambio iónico y permeación en gel, con un factor de purificación de 19.8 veces y una actividad específica de 1430 U/mg de proteína. El peso molecular de la enzima -determinado por SDS -PAGE- fue de 37 kDa. La queratinasa extracelular de *P. lilacinum* se caracteriza por su apreciable estabilidad en un amplio intervalo de pH (4.0 a 9.0), y hasta 65 °C. La inhibición que presenta frente a PMSF (98,2 % de la inhibición) sugiere su naturaleza serínica. La enzima es activa y estable en presencia de solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, metanol, e isopropanol; ciertos tensioactivos como Triton X-100, dodecilsulfato de sodio, y Tween 85, y agentes oxidante como el peróxido de hidrógeno. Sus parámetros cinéticos de inactivación térmica fueron estimados bajo diferentes condiciones y fue posible observar cómo afectan calcio, el glicerol y el propilenglicol a la estabilidad térmica de la enzima. Se investigó la inmovilización covalente de la queratinasa pura sobre un soporte de quitosán, optimizando la concentración de los agentes entrecruzantes glutaraldehído y genipina, así como también el tiempo de activación. La enzima inmovilizada presentó mayor estabilidad frente a pH y temperaturas extremas en comparación con la enzima libre, además retiene 61.37 % de la actividad enzimática inicial después de cinco ciclos de hidrólisis. Se estudiaron las potenciales aplicaciones biotecnológicas del extracto enzimático, entre ellas se estudió por su compatibilidad y estabilidad frente a detergentes comerciales (7 mg / ml) como Ariel y Skip, observándose que éste retiene más de 70 % de su actividad proteolítica inicial después de 1 h de incubación a 40 °C. La simulación de lavado reveló que el extracto era capaz de eliminar eficazmente las manchas de sangre. Se estudió también la posibilidad de utilizar este extracto enzimático en la recuperación de plata a partir de placas radiográficas usadas. En dosis de enzima de 6,9 U azoc/ml y a 60 °C, la eliminación completa de la capa de gelatina con la liberación completa de las partículas de plata se alcanzó en 6 min a pH 9.0. Por último, *P. lilacinum* además de producir enzimas queratinolíticas con la producción de paralela de amonio, mostró la capacidad producir sideróforos y ácido indolacético (IAA) al crecer con residuo pelo como sustrato en presencia de Trp y baja concentración de hierro. Se realizaron ensayos a nivel de invernadero con plantas de tomate, encontrándose que, en términos de peso seco, el hidrolizado mostró un efecto similar al

del fertilizante de referencia. Además, el hidrolizado demostró poseer actividad antifúngica contra varios patógenos de las plantas. Estos resultados indican el potencial biotecnológico tanto del extracto enzimático como el de la enzima pura de *P. lilacinum* siendo interesante además la capacidad del hongo de producir esta enzima utilizando un como sustrato un residuo de valor nulo, con lo cual sería de esperar que su costo de producción resulte relativamente bajo.



# *Microbial keratinases: screening, production and characterization*

## **Abstract**

At present alkaline proteases are widely used in leather processing, detergent formulations, silver recovery process, and in the production of protein hydrolysates. All alkaline proteases are derived from microbial sources that grow on expensive growth substrate. Many studies showed that nearly 40 % of the production costs of these proteases are accounted for by the growth substrate. To reduce the production cost it is important to search for microorganisms capable of growing and producing enough amount of the enzyme using cheap substrates. In this regard keratinaceous wastes ie. *hair waste* has an enormous potential to serve as growth substrates for a group of proteolytic enzymes called keratinases which have the capability to hydrolyze keratin. In this study six non-pathogenic fungal strains isolated from alkaline soils of Buenos Aires Province, Argentina (*Acremonium murorum*, *Aspergillus sidowii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Neurospora tetrasperma*, *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Westerdikella dispersa*) were tested for their ability to produce keratinolytic enzymes. Among these strains, *P. lilacinum* produced the highest proteolytic and keratinolytic activity, both in solid-state and submerged fermentations and was further selected to continue the work. The optimal conditions for proteolytic activity were established with aid of experimental design and response surface methodology. The optimal conditions were determined as 7.10 g/l of glucose; 0.0065 mg/l of CaCl<sub>2</sub> and initial pH of 5.60; at this condition the maximum keratinase yield predicted was 26.7 U/ml. keratinase purification involved precipitation with ammonium sulphate and chromatographic techniques of ion exchange and gel permeation. The final sample obtained after purification steps presents a purification factor of 19.8 fold and specific activity of 1430 U/mg of protein. The molecular weight of the enzyme, determined by SDS-PAGE, was 37 kDa. The extracellular keratinase of *P. lilacinum* was characterized by its appreciable stability over a broad pH range (from 4.0 to 9.0), and up to 65 °C, along with its strong inhibition by phenylmethylsulphonyl fluoride among the protease inhibitors tested (98.2% of inhibition), thus suggesting its nature as a serine protease. The enzyme was active and stable in the presence of organic solvents such as dimethylsulfoxide, methanol, and isopropanol; certain surfactants such as Triton X-100, sodium dodecylsulfate, and Tween 85; and bleaching agents such as hydrogen

peroxide. The kinetics parameters for thermal keratinase inactivation, under different conditions were estimated. It was possible to observe that calcium affect significantly the thermal stability of the enzyme. The developing of a chitosan support for covalent immobilization of the purified keratinase was investigated. The effects of different glutaraldehyde and genipin concentration, as well as, the activation time required for chitosan beads on the enzyme immobilization were investigated. The immobilized enzyme presented higher thermal and pH stability when compared with free one, besides it retained 61.37 % of the initial enzyme activity after five cycles of reuse.

Crude extract was tested for its compatibility with commercial detergents (7 mg/ml) such as Ariel and Skip, retaining more than 70 % of its proteolytic activity in all detergents after 1 h of incubation at 40 °C. Wash performance analysis revealed that this protease could effectively remove blood stains. It was also tested for the recovery of silver from used x-ray films. At enzyme dose of 6.9 U/ml and at 60 °C complete removal of the gelatin layer of used x-ray films was achieved within 6 min at pH 9.0. *P. lilacinum* showed the capability not only to produce keratinolytic activity, but also to produce ammonia, siderophores and indoleacetic acid (IAA) when grow using hair waste as substrate. Using 21-day plat growth assays on tomatoes, the hydrolysate and reference fertilizer were compared. In terms of weight, the hydrolysate showed similar effect as that of the fertilizer. In addition, the hydrolysate showed antifungal activity against several plant pathogens. These results indicate the potential of *P. lilacinum* keratinase for multipurpose industrial application. Because the fungus produces the enzyme using a cheap substrate, its production cost is expected to be very low.

# *Índice de Contenidos*

<i>Capítulo 1</i>	1
<i>Introducción General</i>	1
Queratinas	3
Las queratinas como residuos agroindustriales	4
Microorganismos queratinolíticos – Queratinasas microbianas	7
Enzimas proteolíticas	9
Enzimas queratinolíticas	11
Mecanismo de queratinolisis	13
Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas queratinolíticas	14
Procesamiento de residuos queratínicos	14
Aplicación en formulados de detergentes	15
Aplicación en la Industria del cuero	16
Descontaminación de priones	16
Aplicaciones en el ámbito farmacéutico	17
Otras aplicaciones de las enzimas queratinolíticas	18
Producción de enzimas queratinolíticas - condiciones de cultivo	18
Residuo pelo como sustrato para la producción de enzimas queratinolíticas	19
Bibliografía	22
<i>Capítulo 2</i>	31
<i>Determinaciones Enzimáticas</i>	31
<i>Técnica de medida de actividad proteolítica</i>	33
Introducción	33
Materiales y métodos	36
Preparación del sustrato azocaseína	36
Obtención del extracto enzimático con actividad proteolítica	36
Medida de la actividad azocaseinolítica	36
Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad proteolítica - Ensayo de linealidad	37
Relación entre el sustrato azocaseína comercial y el sustrato sintetizado en laboratorio	37
Resultados y discusión	39
Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad proteolítica - Ensayo de linealidad	39
Relación entre el sustrato azocaseína comercial y el sustrato sintetizado en laboratorio	41
Bibliografía	42
<i>Técnica de medida de actividad queratinolítica</i>	43
Introducción	43
Materiales y métodos	46
Preparación del sustrato azoqueratina	46
Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica	46
Medida de la actividad queratinolítica	46
Efecto del tamaño de partícula en la medida de actividad queratinolítica	47
Efecto de la concentración de sustrato en la medida de actividad queratinolítica	47
Efecto de la disminución del tamaño de partícula a concentración de sustrato fija en la medida de actividad queratinolítica	48
Efecto del tiempo de reacción en la medida de actividad queratinolítica	48
Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad queratinolítica	48
Especificidad del sustrato azoqueratina	49
Resultados y discusión	50
Efecto del tamaño de partícula en la medida de actividad queratinolítica	50
Efecto de la concentración de sustrato en la medida de actividad queratinolítica	50

## Índice de Contenidos

Efecto de la disminución del tamaño de partícula a concentración de sustrato fija en la medida de actividad queratinolítica	52
Efecto del tiempo de reacción en la medida de actividad queratinolítica	53
Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad queratinolítica	54
Especificidad del sustrato azoqueratina	55
Bibliografía	58
<b>Capítulo 3</b>	<b>61</b>
<i>Búsqueda de enzimas queratinolíticas producidas por hongos filamentosos aislados de suelos de la provincia de Buenos Aires</i>	<b>61</b>
Resumen	63
Introducción	64
Hongos subdivisión Deuteromycota: Características Generales	65
Cultivo de hongos imperfectos	71
Materiales y métodos	72
Microorganismos, medios y condiciones de cultivo	72
Conservación de las cepas	72
Ensayo cualitativo de la producción de actividad queratinolítica utilizando Agar Harina de Pluma	73
Producción del inóculo (suspensión de conidios) para los cultivos	73
Cultivos en sustrato sólido y medio líquido	73
Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas	74
Análisis estadístico	74
Resultados y discusión	76
Ensayo cualitativo de la producción de actividad queratinolítica	76
Fermentación en sustrato sólido	77
Fermentación sumergida	79
Conclusiones	81
<b>Capítulo 4</b>	<b>85</b>
<i>Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas queratinolíticas por <i>Purpureocillium lilacinum</i> LPSC#876. Caracterización del extracto enzimático</i>	<b>85</b>
Introducción	89
Materiales y métodos	91
Microorganismo y producción de inóculo	91
Medio y condiciones de cultivo	91
Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas	91
Optimización de los componentes del medio y de ciertos parámetros físicos utilizando la metodología de variación de una variable en el tiempo (one variable at a time)	91
Identificación de los factores significativos mediante el diseño de Plackett-Burman	93
Diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable	94
Caracterización bioquímica del extracto enzimático	95
-Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y la estabilidad enzimática. Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficies de respuesta.	96
Detección de actividades proteolítica y queratinolítica mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma	98
Microscopia de barrido (SEM)	99
Análisis estadístico	100
Resultados y discusión	101
Producción de enzimas queratinolíticas por <i>P. lilacinum</i> LPSC # 876	101
Optimización de las variables de cultivo utilizando la metodología de variación de una variable en el tiempo (one variable at a time)	102
Identificación de los factores significativos mediante el diseño de Plackett-Burman	112



## *Índice de Contenidos*

Diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable (DCCR)	114
Caracterización bioquímica del extracto enzimático	121
Detección de actividades proteolítica y queratinolítica mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma	135
Microscopia de barrido (SEM)	137
Conclusiones	139
Bibliografía	141
<i>Capítulo 5</i>	<i>147</i>
<i>Purificación y caracterización de una queratinasa de <i>Purpureocillium lilacinum</i> LPSC#876</i>	<i>147</i>
Resumen	149
Introducción	150
Materiales y métodos	155
Condiciones de cultivo y procesamiento de la muestra previa purificación de la enzima	155
Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas	155
Purificación de queratinasa de <i>P. lilacinum</i>	155
Determinación del peso molecular de la queratinasa de <i>P. lilacinum</i> y de su actividad queratinasa mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma	158
Caracterización bioquímica de la enzima pura	159
Análisis estadístico	161
Resultados y discusión	162
Purificación de una queratinasa de <i>P. lilacinum</i> a partir de cultivos líquidos	162
Determinación del peso molecular de la queratinasa de <i>P. lilacinum</i> y de su actividad queratinasa mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma	165
Caracterización bioquímica de la enzima pura	166
Conclusiones	180
Bibliografía	183
<i>Capítulo 6</i>	<i>187</i>
<i>Modelado cinético de la inactivación térmica de la queratinasa de <i>Purpureocillium lilacinum</i> LPSC#876. Efecto del agregado de agentes estabilizantes</i>	<i>187</i>
Resumen	189
Introducción	190
Materiales y métodos	192
Fuente de la enzima pura	192
Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas	192
Estudio de la inactivación térmica de la enzima y el efecto de los diferentes agentes protectores sobre dicha inactivación	192
Efecto de la concentración del aditivo sobre la estabilidad térmica	193
Efecto del sobrenadante de un cultivo de <i>P. lilacinum</i> al ser utilizado como solvente. Estudio de la estabilidad térmica de la enzima	193
Modelos cinéticos de inactivación enzimática	194
Análisis estadístico	196
Resultados y discusión	198
Análisis estadísticos de los modelos cinéticos de inactivación enzimática	198
Dependencia de los parámetros cinéticos de modelo de Weibull con la temperatura	201
Estudio del efecto del agregado de iones y polioles sobre la estabilidad térmica de la queratinasa de <i>P. lilacinum</i>	204
Efecto de la concentración del aditivo sobre la estabilidad térmica	208
Efecto del sobrenadante de un cultivo de <i>P. lilacinum</i> al ser utilizado como solvente. Estudio de la estabilidad térmica de la enzima	211
Conclusión	213
Bibliografía	214

## *Índice de Contenidos*

<i>Capítulo 7</i>	217
<i>Inmovilización de una queratinasa de <i>Purpureocillium lilacinum</i> LPSC#876 sobre esferas de quitosán</i>	
Introducción	217
Materiales y métodos	220
Reactivos químicos	229
Fuente de la enzima pura	229
Preparación de esferas de quitosán	229
Activación de las esferas de quitosán	229
Inmovilización de la queratinasa de <i>P. lilacinum</i>	230
Medida de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada	231
Caracterización de la enzima inmovilizada	231
Análisis estadístico	234
Resultados y discusión	235
Inmovilización de la queratinasa de <i>P. lilacinum</i>	235
Caracterización de la enzima inmovilizada	241
Conclusiones	248
Bibliografía	249
<i>Capítulo 8</i>	253
<i>Aplicaciones biotecnológicas del extracto enzimático obtenido de la degradación del residuo pelo por <i>Purpureocillium lilacinum</i> LPSC#876</i>	253
<i>Evaluación del extracto enzimático en la formulación de detergentes comerciales</i>	255
Resumen	255
Introducción	256
Materiales y métodos	260
Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica	260
Medida de la actividad proteolítica	260
Medida de la compatibilidad del extracto enzimático con detergentes comerciales	260
Efecto de agentes blanqueadores sobre la estabilidad enzimática	261
Evaluación de la eficacia de lavado	261
Análisis estadístico	262
Resultados y discusión	263
Medida de la compatibilidad del extracto enzimático con detergentes comerciales	263
Efecto de agentes blanqueadores sobre la estabilidad enzimática	266
Evaluación de la eficacia de lavado	270
Conclusiones	271
Bibliografía	272
<i>Hidrólisis enzimática de placas radiográficas para la recuperación de plata</i>	275
Resumen	275
Introducción	276
Materiales y métodos	280
Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica	280
Medida de la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas (o de las películas de gelatina)	280
Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de las películas de gelatina	280
Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de la película de gelatina	281
Reutilización del extracto enzimático para la hidrólisis completa de las películas de gelatina y remoción total de las partículas de plata	281
Recuperación de plata como cloruro de plata	282
Resultados y discusión	283
Medida de la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas (o de las películas de gelatina)	283
Conclusiones	289

## *Índice de Contenidos*

Bibliografía	290
<i>Aprovechamiento del hidrolizado obtenido de la biodegradación del residuo pelo para su aplicación como promotor del crecimiento vegetal</i>	291
Resumen	291
Introducción	293
Materiales y métodos	297
Obtención del hidrolizado proteico	297
Evaluación de la producción de ácido Indolacético por parte de <i>P. lilacinum</i> LPSC # 876	297
Optimización de la producción de AIA	298
Ensayo de germinación de semillas de tomate platense italiano ( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	299
Estudio del crecimiento de las plantas de tomate a escala de invernadero	299
Ensayo de biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos	300
Cultivo y mantenimiento de los hongos fitopatógenos	301
Resultados y discusión	302
Evaluación de la producción de ácido indolacético por parte de <i>P. lilacinum</i> LPSC # 876	302
Optimización de la producción de AIA	303
Ensayo de germinación de semillas de tomate platense italiano ( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	318
Estudio del crecimiento de las plantas de tomate a escala de invernadero	319
Ensayo de biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos	324
Conclusiones	329
Bibliografía	330
<i>Conclusiones Generales</i>	331



# *Capítulo 1*

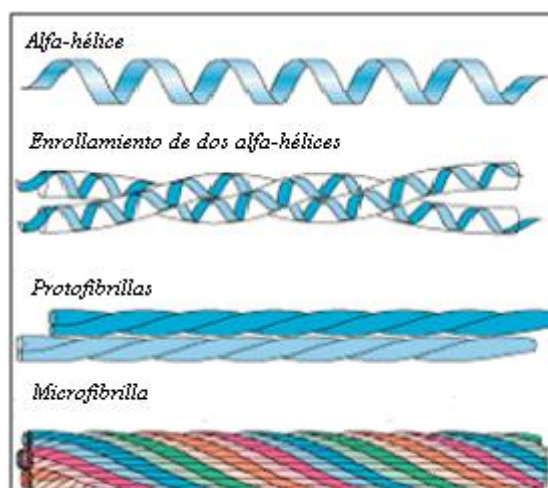
## *Introducción General*



## **Queratinas**

Las queratinas, proteínas estructurales, fibrosas e insolubles encontradas principalmente en vertebrados, son los principales componentes de la piel y sus apéndices (pelos, plumas, uñas, cuernos, pezuñas y lana). Las características principales son su gran estabilidad y resistencia a la degradación por parte de proteasas comunes debido a su empaquetamiento compacto y a la presencia de puentes disulfuro. Las subunidades básicas de estas proteínas se dividen en dos grandes grupos: las queratinas ácidas y las queratinas básicas (y neutras). Existen alrededor de veinte subunidades básicas, denominadas del uno al veinte como  $k_1$ ,  $k_2$ ...,  $k_{20}$ . Las ocho primeras son queratinas básicas o neutras, mientras que las restantes son queratinas ácidas. La unión de estas subunidades da lugar a distintos tipos de queratinas. Hasta hoy, se han descrito al menos treinta tipos distintos de queratinas. Cada cadena polipeptídica (estructura primaria) posee un dominio helicoidal de alrededor de 310 aminoácidos y se encuentra flanqueada por una cabeza más corta (dominio N-terminal) y una cola (dominio C-terminal) no helicoidales que se cree que tienen una conformación flexible (Bragulla & Homberger, 2009). Estas cadenas polipeptídicas se empaquetan formando dos tipos de estructuras secundarias:  $\alpha$ -hélice u hoja  $\beta$ -plegada. Una primera clasificación de las queratinas se realiza de acuerdo a su empaquetamiento en  $\alpha$ -queratinas (pelos, uñas, lana y extracto córneo) y  $\beta$ -queratinas (plumas). Estas cadenas (independientemente de su configuración) se disponen en forma paralela para formar micro y macro fibrillas que le confieren estabilidad a la molécula de queratina (Kreplak et al., 2004).

El modelo de empaquetamiento de la queratina, comienza con dos cadenas polipeptídicas las cuales se enrollan en una disposición característica de cabeza-cola para formar un dímero, varios dímeros luego se ensamblan formando un protofilamento y dos de estos protofilamentos constituyen luego una protofibrilla (Figura 1).

Figura 1. Modelo de empaquetamiento de  $\alpha$ -queratina

Cuatro protofibrillas constituirán una microfibrilla, la cual se asociará con otras microfibrillas para formar una macrofibrilla. Los puentes disulfuro ocurren entre las protofibrillas y también entre las microfibrillas, son éstos junto con enlaces del tipo puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces salinos los que confieren estabilidad mecánica y resistencia a la degradación tan característica de estas proteínas (Voet & Voet, 1995).

Como se mencionó anteriormente, las queratinas pueden clasificarse de acuerdo a su estructura secundaria o empaquetamiento en  $\alpha$  y  $\beta$ - queratinas. Existe una segunda clasificación de estas proteínas de acuerdo al contenido de residuos de cisteína que posea. Se clasifican en queratinas blandas (*soft keratins*) y queratinas duras (*hard keratins*). Las queratinas blandas presentan muy bajo contenido de cisteínas y por ende un bajo contenido de puentes disulfuro (hasta un 2% de residuos de cisteínas) y son las que forman parte del estrato corneo de la piel, en tanto que las queratinas duras son aquellas que presentan un alto contenido de cisteínas. En este último grupo se encuentran  $\alpha$ -queratinas de pelos y lana (10.5-17 % de residuos de cisteínas (Barone et al., 2005; Brandelli et al., 2010) y  $\beta$ -queratinas de plumas (4.2-7.6 % de residuos de cisteínas) (Takahashi et al., 2004; Bertsch & Coello, 2005).

### Las queratinas como residuos agroindustriales

Los pelos y las plumas son los dos principales residuos de naturaleza queratínica producidos por actividades agroindustriales y presentan un serio problema ambiental



## *Introducción General*

debido a su escasa utilidad como materia prima y la consecuente necesidad de disposición (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010).

La economía de Argentina se ha basado tradicionalmente en la agricultura e industrias relacionadas. Tanto la ganadería (ganado vacuno, ovino y aves de corral) como los cereales han sido el baluarte de su riqueza, y sus productos cárnicos se encuentran entre los mejores del mundo. En el año 2012 había en la Argentina alrededor de 53 millones de cabezas de ganado (vacuno, ovino, porcino, equino y caprino), de las cuales el 70 % correspondía a ganado bovino (Shorthorn, Heresford, Aberdeen Angus y Holando argentino) seguido por el 18 % de ganado ovino, con una faena estimada en 4.75 millones de cabezas de ganado bovino en los primeros 6 meses del mismo año. Ligada a esta actividad ganadera se encuentran las curtiembres. Éstas, junto con los frigoríficos, las empresas petroleras y de galvanoplastia representan uno de los sectores productivos más contaminantes del país. El curtido de cuero fue una de las primeras industrias en desarrollarse en la Argentina y desde entonces se destaca por su participación en las exportaciones nacionales. Los primeros pasos de la industria se remonta hacia fines del siglo XVII donde el cuero era el producto principal y la carne un subproducto de éste. Este sector se constituye como la industria tradicional de nuestro país hacia el siglo XIX en conjunto con el desarrollo de la ganadería y la industria frigorífica. La producción de cuero bovino producido fluctuó entre las 333.6 mil toneladas en el año 2004 y las 359 mil toneladas en el año 2008. Durante el año 2009, el sector de curtiembre tuvo una producción anual de 3.331 millones de pesos (total de ventas). El sector curtidor se ha concentrado mayoritariamente en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, aunque existen numerosos establecimientos en Córdoba, San Luis, Mendoza y Entre Ríos. En la actualidad, en la Cuenca Matanza-Riachuelo existen 247 curtiembres, de las cuales 196 están en actividad. El proceso del curtido del cuero es una actividad química muy intensiva que genera importantes volúmenes de residuos, tanto sólidos como líquidos, con una combinación extremadamente compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, que hacen –como se mencionó anteriormente- que el sector sea altamente contaminante. Dentro de estos residuos se encuentra un residuo de naturaleza queratínica llamado **residuo pelo**. Este residuo sólido generado a partir de un proceso de depilado conservador del pelo vacuno es en la actualidad dispuesto totalmente en los rellenos sanitarios.



Figura 2. Fulones de procesamiento de pieles (derecha) y residuo pelo proveniente de un depilado conservador del pelo (izquierda)

En cuanto a la industria avícola, Argentina ha experimentado un fuerte crecimiento durante los últimos años, tanto en mercados locales como internacionales. A nivel nacional, en el año 2003 se produjeron 740 mil toneladas de pollo, con un consumo por habitante de casi 21 kilos anuales y una exportación de 25 mil toneladas. De acuerdo con el Centro de Empresas Procesadoras Avícolas, en el año 2012, esta cifra aumentó a 2 millones de toneladas, con un consumo de 42 kilos para el mercado interno y exportaciones por 300 mil toneladas, observándose entonces un crecimiento exponencial. En términos de faena, durante el último año se procesaron alrededor de 733 millones de pollos. La provincia de Entre Ríos es sin duda la que mayor cantidad de granjas avícolas concentra en el país, con más de 2500 granjas productoras de pollos de engorde y huevos. Considerando un peso promedio de 2.5 Kg de un ejemplar adulto y, teniendo en cuenta el hecho de que la pluma constituye casi 8.5 % del peso total de un pollo, la cantidad de residuos sólidos generados en el último año sería de aproximadamente 155 millones de kilogramos. EE.UU. e India han producido anualmente alrededor de 140 y 1044 millones de kilos, respectivamente.

Actualmente, en nuestro país, una pequeña porción de este residuo queratínico es destinado a la producción de harina de plumas que luego se exporta como alimento para peces, siendo Chile el principal consumidor de este producto, mientras que la mayor parte es incinerada o depositada como residuo sólido en rellenos sanitarios, generando un gasto extra a las empresas. El método tradicional y más utilizado para la obtención de harina de plumas consiste en un tratamiento térmico con alta presión, en el cual las

## *Introducción General*

plumas son sometidas a temperaturas de 150 °C - 160 °C hasta por 60 minutos con presiones de hasta 3.5 bares. Este método da origen a una harina de plumas en cuya composición se presenta en desequilibrio en aminoácidos esenciales, con déficit en metionina, lisina y triptófano, por ser éstos lábiles al calor. Además de presentar baja digestibilidad por animales monogástricos adultos (Riffel & Brandelli, 2006).



Figura 3. Residuos de las empresas avícolas. Las garras, picos, plumas salen como un todo y se trasladan en camiones para su disposición final.

Por lo tanto, tanto las curtiembres y las empresas avícolas, son hoy en Argentina dos sectores altamente contaminantes, productores de una inmensa cantidad de residuos sólidos de naturaleza queratínica, los cuales en su mayoría son dispuestos en rellenos sanitarios sin tener en cuenta el potencial que revisten. Dado que son casi totalmente proteína (90 % de su composición es queratina), el tratamiento biológico de estos residuos es una opción atractiva y potencialmente viable que da origen a productos con alto valor agregado, disminución de la contaminación ambiental y menor consumo de energía.

### **Microorganismos queratinolíticos – Queratinasas microbianas**

A pesar de su naturaleza recalcitrante y la elevada resistencia a la degradación, las queratinas no se acumulan en la naturaleza, poniendo en evidencia la existencia de microorganismos queratinolíticos que son capaces de degradar esta proteína. Los microorganismos queratinolíticos son aquellos microorganismos capaces no sólo de colonizar sino también degradar la queratina gracias a la capacidad de los mismos de

## *Introducción General*

producir enzimas proteolíticas específicas llamadas *queratinasas* (Onifade et al., 1998; Filipello Marchisio et al., 2000; Kunert, 2000). Estos microorganismos se encuentran en una gran variedad de hábitats con diferentes condiciones ambientales y ecológicas, revelando la amplia capacidad de degradar distintos tipos de queratinas y otros sustratos proteicos compactos. Han sido aislados en ambientes tan extremos como suelos antárticos y aguas termales, incluyendo ambientes aeróbicos como anaeróbicos, y entre ellos se encuentran bacterias, hongos y actinomicetos (Lucas et al., 2003; Elíades et al., 2010; Bach et al., 2011). Sin embargo, su presencia y distribución dependen de la disponibilidad de queratina, y en este sentido tanto el hombre como los animales ejercen una presión selectiva positiva en el ambiente (Rao et al., 1998; Filipello Marchisio et al., 2000).

Dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas, el género *Bacillus* es sin duda el que mayor reporte de producción de queratinasas tiene. Diversas cepas de *B. licheniformis* (Lin et al., 1999; Okoroma et al., 2012), *B. subtilis* (Macedo et al., 2005; Balaji et al., 2008), *B. cereus* (Ghosh et al., 2008) y *B. pumilis* (Kumar et al., 2008) son descritas como queratinolíticas. Es más, *B. licheniformis* es la fuente de la primer enzima queratinolítica comercializada a nivel mundial conocida con el nombre de Versazyme<sup>®</sup>, desarrollada por Shih y colaboradores para Bioresource International, Inc.

Ciertas cepas termófilas y alcalofílicas dentro del género *Bacillus* también han sido reportadas como queratinolíticas, y entre ellas se encuentran *B. halodurans* AH-101 (Takami et al., 1989), *B. pseudofirmus* AL-89 y FA30-01 (Gessesse et al., 2003a; Kojima et al., 2006). Fuera del género *Bacillus*, otras bacterias Gram-positivas también han sido reportadas como productoras de queratinasas: *Lysobacter* NCIMB 9497 (Allpress et al., 2002), *Kocuria rosea* (Bernal et al., 2006), *Kytococcus sedentarius* (Longshaw et al., 2002), *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov (Ionata et al., 2008) y *Microbacterium* sp. kr10 (Thys et al., 2004).

El género *Streptomyces* -dentro de los actinomicetos- es el género reportado con mayor frecuencia como productor de enzimas queratinolíticas y algunos de ellos como *S. flavis* 2BG han sido aislados de lugares remotos como suelos antárticos (Gushterova et al., 2005). Dentro de las especies termófilas se encuentran *S. gulfaguensis* (Syed et al., 2009), *S. thermoviolaceus* (Chitte et al., 1999) y *S. thermonitrificans* (Mohamedin,

## *Introducción General*

1999) y dentro de las mesófilas *S. pactum* DSM 40530 (Böckle et al., 1995), *S. graminofaciens* (Szabó et al., 2000) y *S. albidoflavus* K 1-02 (Bressollier et al., 1999).

Comparadas con las bacterias Gram-positivas, las bacterias Gram-negativas reportadas como productoras de enzimas queratinolíticas son relativamente escasas, se pueden mencionar entre ellas *Aeromonas* sp. (Bach et al., 2011), *Vibrio* sp kr2 (Sangali & Brandelli, 2000), *Chryseobacterium* spp. (Riffel et al., 2003; Wang et al., 2008), *Serratia* spp. (Khardenavis et al., 2009) y *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) spp. (Cao et al., 2009). *Fervidobacterium pennavorans* (Friedrich & Antranikian, 1996), *Fervidobacterium islandicum* (Nam et al., 2002) y *Meiothermus ruber* H328 (Suzuki et al., 2006) han sido aislados de aguas termales, respiraderos solfatáricos y áreas volcánicas.

Dentro de las especies fúngicas reportadas como queratinolíticas encontramos aquellas de importancia médica (dermatofitos) como *Trichophyton* y *Microsporum* (Wawrzekiewicz et al., 1991; Filipello Marchisio et al., 2000; Moallaei et al., 2006), y hongos no dermatofitos como *Aspergillus* (Santos et al., 1996; Farag & Hassan, 2004), *Trichoderma* (Cao et al., 2008), *Doratomyces* (Gradišar et al., 2000), *Myrothecium* (Moreira-Gasparin et al., 2009), *Paecilomyces* (Gradišar et al., 2005; Cavello et al., 2012) y también *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Curvularia* y *Penicillium* (Marcondes et al., 2008; Elíades et al., 2010).

### **Enzimas proteolíticas**

Las enzimas proteolíticas son un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos en solución acuosa través de la adición de agua entre los enlaces peptídicos (Beg & Gupta, 2003). Pertenecen al grupo de las hidrolasas y son constituyentes esenciales de todas las formas de vida en la Tierra, incluyendo procariontes, hongos, plantas y animales. Constituyen uno de los grupos más importantes de enzimas comerciales con extensa aplicación en diferentes sectores industriales como lo son la industria de los detergentes, la industria alimenticia, la industria del cuero, en la industria farmacéutica, en el tratamiento de residuos, síntesis de péptidos, etc (Godfrey, 1996; Onifade et al., 1998; Rao et al., 1998). La mayoría de las enzimas proteolíticas que se encuentran en el mercado son de origen bacteriano o fúngico y representan cerca

## *Introducción General*

del 60 % del total de las ventas mundiales de enzimas (Gupta et al., 2002; Shankar et al., 2011).

En la industria de los detergentes, el uso de enzimas proteolíticas como aditivos ayuda a la remoción de manchas proteicas como sangre, huevo, aquellas generadas del roce de las prendas con la piel, etc. mejorando la eficiencia del lavado por estos detergentes. Los detergentes comerciales trabajan a pHs alcalinos y contienen en su formulación surfactantes, agentes blanqueadores, perfumes y agentes secuestrantes o quelantes, estos últimos destinados a contrarrestar la dureza del agua de lavado. Así, las proteasas destinadas al uso en detergentes deben cumplir con ciertos requisitos entre los que se encuentran: ser compatibles y estables frente a dichos compuestos y a pH alcalinos (Kumar & Takagi, 1999; Banik & Prakash, 2004). Desafortunadamente, pocas de las proteasas utilizadas actualmente en esta industria poseen estas características (Gupta et al., 2002; Joo et al., 2004).

En la industria alimenticia, las proteasas han sido utilizadas en quesería, panificación, en la producción de aspartame, en la producción de derivados de la soja, etc (Rao et al., 1998). Por otro lado y relacionado con la industria alimenticia animal, la demanda mundial de productos cárnicos como pollos, carnes vacunas y cerdos para consumo humano lleva a la necesidad de producción a gran escala de suplementos alimenticios o hidrolizados proteicos para la alimentación animal. Entre los suplementos alimenticios se encuentran la harina de plumas, la harina de hueso, de sangre y de pescado. Para la producción de estos aditivos se utilizan métodos físicos y químicos que terminan por disminuir el contenido de aminoácidos esenciales en estos productos haciendo que la utilización de enzimas para su producción sea cada vez mejor visto (Gupta & Ramnani, 2006).

En las curtiembres, los depilados convencionales conducen a tener una elevada carga orgánica en el efluente debido a la destrucción incontrolada del pelo por el uso de sulfuro de sodio y cal, además de aportar la totalidad del sulfuro presente en el efluente de la ribera. A partir de la década del '90 se han desarrollado diferentes depilados conservadores del pelo para reducir la carga orgánica, el contenido de sulfuro, y de los sólidos suspendidos sedimentables. Las proteasas son comúnmente utilizadas en el procesamiento de las pieles en las etapas que conforman el proceso de ribera (remojo,

## *Introducción General*

purga y depilado). El uso de estas enzimas en el proceso de depilado ayudan a reducir e incluso podrían evitar en uso de cal y sulfuro, ofreciendo enormes beneficios ambientales (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002). Sin embargo, el uso de las proteasas es aún limitado en este tipo de industrias, no solo por el costo de producción de las mismas, sino también por la baja especificidad que poseen éstas poseen (Foroughi et al., 2006).

La amplia diversidad y especificidad que presentan las proteasas es de gran ventaja a la hora de desarrollar agentes terapéuticos eficaces. Por ejemplo, la administración por vía oral de proteasas de *Aspergillus oryzae* (Luizym y Nortase<sup>®</sup>) es actualmente utilizada para corregir ciertas deficiencias de enzimas líticas. Enzimas proteolíticas como una colagenasa clostridial o una subtilisin proteasa han sido utilizadas en combinación con antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de quemaduras y heridas y una asparginasa de origen bacteriano se utiliza en la eliminación de asparagina del torrente sanguíneo de personas con leucemia linfocítica (Rao et al., 1998).

### **Enzimas queratinolíticas**

Las queratinasas (E.C.3.4.99.xx) son una clase particular de proteasas que presentan la capacidad de degradar la queratina. Para distinguir las queratinasas de las proteasas convencionales varios autores han propuesto que en vez de tener en cuenta la actividad absoluta sobre sustratos queratínicos, se debe tomar la relación entre la hidrólisis del sustrato queratínico y un sustrato proteico, por ejemplo caseína (Q:C). Una relación igual o mayor a 5 se toma como la ideal para definir una queratinasa. Esta propuesta ha sido respaldada al determinar esta relación para proteasas comunes como tripsina y papaína y encontrar relaciones de 0.08 y 0.51, respectivamente, en tanto que para queratinasas producidas por *Bacillus* sp., *Chryseobacterium indologenes* y *Kocuria rosea* esta relación fue de 12.1, 10 y 16 respectivamente (Bernal et al., 2006; Wang et al., 2008; Prakash et al., 2010).

La mayoría de las queratinasas microbianas, independientemente del microorganismo productor, son proteasas alcalinas o neutras, extracelulares, con un pH óptimo en el rango de 7.5-9.0, aunque existen excepciones como la expresada por

## *Introducción General*

*Nocardiosis* sp. TOA-1 que posee pHs óptimo extremadamente alcalinos ( $> 12.5$ , (Mitsuiki et al., 2004)). El rango de temperatura óptima que presentan estas enzimas se encuentra entre los  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , así las queratinasas producidas por *S. pactum* DSM 40530, *Streptomyces* sp. SK1-02, *Scopulariopsis brevicaulis*, *B. licheniformis* y *K. rosea* muestran una temperatura óptima dentro de este rango (Böckle et al., 1995; Letourneau et al., 1998; Bressollier et al., 1999; Bernal et al., 2006). Las queratinasas de *Bacillus* sp. B189 y *Fervidobacterium islandicum* AW-1 presentan temperaturas óptimas excepcionalmente altas como  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Nam et al., 2002). Por lo general estas enzimas son activas y estables en un amplio rango de pH (5.0-9.0) y temperatura, reportándose estabildades tan altas como 6 h a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la queratinasa de *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Riessen & Antranikian, 2001).

En general, estas enzimas poseen un peso molecular menor que 50 kDa, pero se han reportado casos donde el peso molecular fue incluso mucho menor (18 kDa, (Bressollier et al., 1999) o mucho mayor (240 kDa, Bernal et al., 2006). Hasta la actualidad, las proteasas queratinolíticas, en su totalidad pertenecen a la familia de las serinproteasas o a la familia de las metaloproteasas (Brandelli et al., 2010). Tatineni et al. (2008) reportaron una queratinasa producida por *Streptomyces* sp. S7 que muestra una naturaleza dual (serin-metaloproteasa) ya que es inhibida tanto por inhibidores específicos para serinproteasas (fenil metil sulfonil fluoruro, PMSF) como para metaloproteasas (1,10 - fenantrolina).

La presencia de iones metálicos divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  generalmente estimulan la actividad queratinolítica, en tanto que los metales pesados y de transición como  $\text{Cu}^{+2}$  o  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  y  $\text{Pb}^{+2}$  inhiben dicha actividad (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003; Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010).

Las queratinasas presentan una amplia especificidad de sustratos y son activas frente a sustratos proteicos solubles e insolubles. Son capaces de hidrolizar proteínas solubles como caseína, gelatina, seroalbúmina bovina y hemoglobina e insolubles como aquellas presentes en plumas, lana, seda, extracto corneo, pelos y uñas y colágeno y elastina (Gupta & Ramnani, 2006).



### **Mecanismo de queratinolisis**

La degradación de la queratina por parte de los microorganismos queratinolíticos sigue la misma secuencia de eventos que la degradación de cualquier otro sustrato sólido: adhesión, colonización, producción de hidrolasas específicas seguido de la desintegración y degradación posterior del sustrato (Suzuki et al., 2006). Dado que el estudio diferencial de los genes o de la expresión de las proteínas en la degradación de la queratina por parte de estos microorganismos no ha sido desarrollado aún, el mecanismo de queratinolisis sigue siendo incierto. En la actualidad se postula un modelo que incluye dos eventos principales: la *sulfitólisis* (rotura de los puentes disulfuros presentes en la molécula de queratina) seguida del *ataque proteolítico* por las queratinasas, las cuales además de clivar los enlaces peptídicos de la molécula de queratina también clivan los residuos hidrofóbicos presentes en la superficie de la molécula (Ramnani & Gupta, 2007).

La sulfitólisis puede ser llevada a cabo por enzimas (disulfuro reductasas), agentes químicos y por sistemas redox presentes en el microorganismo. Böckle et al. (1995) demuestran el mecanismo de sulfitólisis mediante agentes químicos al encontrar que la acumulación de sulfito en el sobrenadante de un cultivo de *Streptomyces* sp. acelera la degradación de las plumas por parte de las queratinasas del microorganismo. Por su parte, Ramnani & Gupta (2007) demostraron que la degradación completa de plumas pudo ser llevada a cabo por el extracto enzimático libre de células sólo si se le adicionaba células de *B. subtilis* WB600 como fuente del sistema redox y, finalmente, Prakash et al. (2010) reportan una queratinasa con actividad disulfuro reductasa.

Cabe aclarar que aún en presencia de un ambiente reductor, sólo las queratinasas son capaces de degradar la queratina, en tanto que proteasas convencionales como papaína, pepsina o tripsina no pueden hacerlo. Las proteasas convencionales sólo serían capaces de degradar la queratina si antes de actuar éstas, actúan las queratinasas clivando los residuos hidrofóbicos presentes en la superficie de la queratina (Ramnani & Gupta, 2007). (Figura 7)

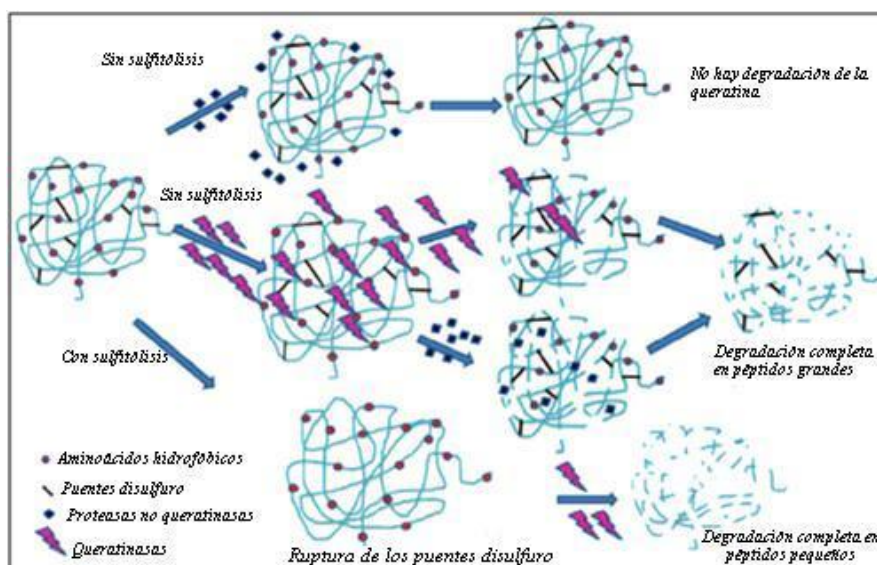


Figura 7. Representación esquemática de la degradación de queratina por parte de queratinasas y proteasas convencionales

### **Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas queratinolíticas**

En virtud a su amplia especificidad de sustratos, robustez y diversas propiedades bioquímicas, las queratinasas son consideradas como nuevos biocatalizadores con potenciales aplicaciones en varias industrias (Brandelli et al., 2010). Además de poder reemplazar a las proteasas convencionales en las aplicaciones industriales, estas nuevas enzimas son de inmensa utilidad en sectores como el del reciclaje de residuos, especialmente las plumas, en el sector de curtido de pieles, en la industria textil, para el desarrollo de fertilizantes y en la cosmética. Las más recientes aplicaciones de las queratinasas es su uso en la descontaminación de priones y como potenciador de agentes antimicóticos ungueales (Gupta et al., 2013).

### **Procesamiento de residuos queratínicos**

#### *Harina de plumas como alimento*

Como se mencionó anteriormente, las plumas se utilizan actualmente para la preparación de harina de pluma, la cual es utilizada como suplemento en la alimentación animal. El método de obtención de esta harina por presión y temperatura, además de poseer un alto costo, produce la destrucción de ciertos aminoácidos esenciales como la

## *Introducción General*

metionina, lisina y triptófano, dando como resultado un producto de pobre digestibilidad y calidad nutricional variable (Wang & Parsons, 1997). La baja calidad nutricional de la harina de plumas puede ser mejorada mediante el uso de microorganismos queratinolíticos. La fermentación de las plumas por estos microorganismos ha demostrado que incrementa los niveles de aminoácidos esenciales como metionina, lisina y arginina. Las curvas de crecimiento de pollos de engorde obtenidas en los ensayos de alimentación utilizando un hidrolizado de plumas de *B. licheniformis* PDW1 y como estándar harina de soja, resultaron ser idénticos, demostrando la posibilidad de remplazar a la harina de soja en los formulados dietarios (Williams et al., 1991).

### *Harina de plumas como fertilizante*

El hidrolizado proteico obtenido de la degradación de las plumas por parte de microorganismos queratinolíticos puede ser también utilizado como un fertilizante orgánico (Choi & Nelson, 1996). Las granjas orgánicas (agricultura ecológica) se basan en el uso de enmiendas orgánicas ricas en nitrógeno, las cuales tiene un doble propósito: por un lado mejoran el crecimiento de las plantas y por el otro intensifican la actividad microbiana del suelo. Tradicionalmente el guano se ha utilizado en estas granjas como fertilizante, pudiendo suplantarse por el hidrolizado proteico de plumas. Se ha demostrado el potencial uso de este hidrolizado por parte de Brandelli et al. (2008) y Adetunji et al. (2012).

### *Aplicación en formulados de detergentes*

Las enzimas proteolíticas son uno de los ingredientes estándar de los detergentes que van desde los detergentes para la ropa hasta los utilizados en la limpieza de lentes de contacto o de dentaduras postizas. Si bien hay poca información en la literatura sobre el uso de las queratinasas como aditivos de detergentes, Hmidet et al. (2009), Rai & Mukhejee (2009) y Sivakumar et al. (2012) ratifican el potencial uso de estas enzimas en las distintas formulaciones deterativas. A diferencia de las proteasas convencionales, las queratinasas poseen la capacidad de unirse e hidrolizar los sustratos sólidos, lo que les confiere aún más atractivo a la hora de utilizarlas en esta industria, donde en muchas oportunidades es necesario que las enzimas actúen sobre sustratos proteicos de

## *Introducción General*

naturaleza queratínica unidos a superficies sólidas como los cuellos de las camisas y puños (Gessesse et al., 2003b; Brandelli et al., 2010).

Otra posible aplicación de las queratinasas es como aditivo en productos para la limpieza de drenajes y cañerías obstruidas con residuos queratínicos (Farag & Hassan, 2004).

### ***Aplicación en la Industria del cuero***

Como se menciono anteriormente, el uso de las proteasas convencionales en esta industria es aún limitado, no sólo por el costo de producción de las mismas, sino también por la baja especificidad que poseen las enzimas que actualmente se disponen (Foroughi et al., 2006). A favor de las queratinasas se encuentra justamente la especificidad que poseen las mismas de degradar diversos sustratos. En este sentido, las queratinasas con nula actividad colagenasa y poca actividad elastinolítica están siendo investigadas para su aplicación en el proceso de depilado. Las queratinasas producida por *B. subtilis* S14 (Macedo et al., 2005; Macedo et al., 2008) o por *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 (Nagal et al., 2010) han sido reportadas como potenciales agentes depilantes al ser capaces de remover los pelos de las pieles vacunas sin dañar el colágeno.

### ***Descontaminación de priones***

Los priones son agregados de proteínas recalcitrantes que causan graves trastornos neurodegenerativos tales como las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET). El aumento de los casos de transmisión horizontal de animales a humanos y de transmisión iatrogénica por instrumentos contaminados ha llevado a la necesidad de extremar la descontaminación de priones. Los métodos actuales de descontaminación de priones utilizan altas temperaturas, pH extremos y productos químicos (Taylor, 2000). Los priones presentan una estructura altamente agregada similar a la que presenta la queratina, razón por la cual, las queratinasas capaces de degradar de manera eficiente la  $\beta$ -queratina de plumas han sido consideradas como

## *Introducción General*

candidatas para la descontaminación de priones. En el año 1997 se reportó la primera queratinasa producida por *B. licheniformis* PWD-1 capaz de degradar el prion PRP<sup>SC</sup> (Lin et al., 1997) y a partir de allí los estudios dirigidos a la aplicación de enzimas queratinolíticas en este campo han ido creciendo. Se ha encontrado que queratinasas producidas por diferentes microorganismos han presentado la capacidad de degradar PRP<sup>SC</sup> sin tratamiento físico previo. Por ejemplo, las queratinasas de *Nocardioopsis* sp. TOA-1 (Mitsuiki et al., 2004), de *Thermoanaerobacter* sp. (Suzuki et al., 2006) y de *Streptomyces* sp (Tsiroulnikov et al., 2004) han sido reportadas para la aplicación de descontaminación de instrumentos quirúrgicos.

### ***Aplicaciones en el ámbito farmacéutico***

La onicomycosis es la infección fúngica de uñas y dedos de los pies cuyo tratamiento implica el uso de anti fúngicos orales. Estos tratamientos generalmente se encuentran asociados a efectos adversos sistémicos (Murdan, 2002). Un tratamiento alternativo es la aplicación tópica de las drogas anti fúngicas en forma de cremas o lacas. Sin embargo la principal limitación de estas aplicaciones es la poca permeabilidad a los fármacos que presentan las uñas, conduciendo a infecciones recurrentes. Para aumentar la permeabilidad de la uña, se suelen utilizar productos químicos como N-acetil-cisteína, mercaptoetanol o N-2 mercaptoetanol (Sun et al., 1999; Malhotra & Zatz, 2002). Estos productos químicos son necesarios en una alta concentración produciendo un olor acre indeseable. Dado que la lámina ungueal está compuesta mayormente por queratina, la permeabilidad a los medicamentos puede ser incrementada con el uso de queratinasas. Los estudios del uso de queratinasas como potenciadores ungueales, permitiendo el aumento de la permeabilidad ungueal, se limitan a escala de laboratorio (Mohorcic et al., 2007).

Las queratinasas también encuentran aplicación en la industria cosmética para la eliminación de acné, de callos y cicatrices y también como ingrediente de cremas depilatorias (Friedrich & Kern, 2003; Gradišar et al., 2005).

***Otras aplicaciones de las enzimas queratinolíticas***

Otras posibles aplicaciones de las queratinasas son en la producción de films y recubrimientos biodegradables a base de queratinas de plumas (Barone & Arikan, 2007), la producción de biogás (Forgács et al., 2011), el desarrollo de medios de cultivo para la producción de endotoxinas para combatir las larvas de mosquitos (Poopathi & Abidha, 2008) y como alternativa a la Proteinasa K en el aislamiento de DNA (Kwon et al., 1994).

**Producción de enzimas queratinolíticas - condiciones de cultivo**

Las enzimas queratinolíticas se han producido de manera habitual a través de fermentación sumergida y recién a partir del año 2002 comienzan a aparecer reportes de la producción de estas enzimas utilizando la fermentación en sustrato sólido, sin embargo, en la actualidad siguen siendo escasos estos reportes (Singh et al., 1999; Nam et al., 2002; Gioppo et al., 2009).

Generalmente, las queratinasas se han producido en medios minerales mínimos con sustratos queratínicos como fuentes de carbono, nitrógeno y energía (Lin et al., 1999), sin embargo hay excepciones en donde el uso de sustratos queratínicos no ha sido necesario para inducir la producción de estas enzimas, por ejemplo se ha reportado el uso harina de soja (Pillai & Archana, 2008); leche descremada (Mitsuiki et al., 2004), harina de cascara de camarón (Wang et al., 2008), gelatina (Thys & Brandelli, 2006), etc.

El efecto de la suplementación del medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno da resultados muy variables, dependiendo del microorganismo en cuestión, del sustrato queratínico y de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno adicionales (Cheng et al., 1995; Brandelli, 2005; Anbu et al., 2007), lo que demuestra que la composición del medio debe ser optimizada para cada situación estudiada (Cai & Zheng, 2009).

## **Residuo pelo como sustrato para la producción de enzimas queratinolíticas**

Uno de los principales obstáculos en la producción de enzimas a nivel comercial es el costo de producción de las mismas. Se estima que la composición del medio de cultivo representa cerca del 30 al 40 % del costo total de producción a nivel industrial (Kumar et al., 2010). Por lo tanto, la búsqueda de sustratos alternativos puede contribuir a la disminución del coste de producción de estas enzimas y por lo tanto causar la reducción de los costos de los procesos en los que se emplean las mismas.

Hoy en día las curtiembres deben mantener un mercado local y también llegar a un mercado internacional cumpliendo con los estándares de calidad del cuero, y al mismo tiempo deben asegurar que los efluentes gaseosos y líquidos, satisfagan las normas de descarga y tener una disposición adecuada de los residuos sólidos. Dentro de los procesos de ribera (*beamhouse processes*), el proceso de depilado/desencalado, es el que tiene la mayor influencia en estos requisitos.

El contenido total de materia orgánica y la presencia de sólidos en suspensión en el efluente líquido de una curtiembre depende en gran medida del proceso de depilado utilizado, siendo el método convencional –basado en sulfuro de sodio y cal- el que lleva a este efluente a los máximos valores de contaminación permitidos. Como alternativa al proceso convencional, donde el pelo es disuelto en sulfuro y cal, el proceso de depilado conservador del pelo tiene como beneficio hacia el medio ambiente una disminución de la contaminación en el efluente líquido de ribera. En términos de DQO (demanda química de oxígeno), de concentración de sulfuros y de sólidos en suspensión, se observa una reducción de hasta el 60 %, 50 % y 75 % respectivamente. Sin embargo, como contraparte, durante este procedimiento se genera un nuevo residuo sólido llamado “*residuo pelo*”, el cual es separado del efluente líquido generalmente por filtración. En un depilado conservador del pelo se produce aproximadamente el 10 % de residuo pelo en estado húmedo (humedad 70-75 %) respecto al peso de una piel vacuna salada.

Como se mencionó anteriormente, en la Cuenca hídrica Matanza- Riachuelo (Provincia de Buenos Aires) existen alrededor de 247 curtiembres, de las cuales 196 se encuentran hoy en actividad y procesan cada una, más de mil pieles por día. A nivel nacional, las pieles procesadas diariamente asciende a las 600 toneladas diarias,

## *Introducción General*

generándose entonces más de 50 toneladas diarias de este residuo, dando una idea de la magnitud del problema ambiental que se ha ido generando a lo largo de los años (Galarza et al., 2010). Si bien no es considerado un residuo peligroso por la legislación argentina (Ley 24.051) el problema ambiental que provoca este residuo es debido al gran volumen con que se genera diariamente y su alta resistencia a la degradación.

Un análisis típico del residuo pelo -obtenido de un depilado conservador de pelo, utilizando sulfuro/cal y mercaptanos como agente depilante- revela que por cada 100 g de residuo pelo (filtrado y con una humedad del 75 %), 25-30 % sólidos totales; lípidos 2-4 %; nitrógeno total 11-15 %;  $\text{Ca}^{+2}$  2-3 %;  $\text{Na}^{+}$  1-2% y S 3-5 %. En tanto que la cantidad de sulfuros en una muestra de residuo pelo húmeda (75 % de humedad) es de 80-100 mg  $\text{SH}_2$  /kg de residuo. El componente orgánico mayoritario en este residuo es la proteína queratina (95 %), en tanto que el 5 % restante son proteínas no queratinas que pueden ser extraídas con soluciones buffers (Galarza et al., 2004).

Motivados por la problemática ambiental que genera este residuo y con la visión de la posibilidad de utilizarlo como un sustrato gracias a las características antes mencionada y más aun teniendo en cuenta su nulo valor económico, se planteó el siguiente trabajo de tesis.

Actualmente los procesos enzimáticos han ido reemplazando a ciertos procesos químicos tradicionales, ya sea por cuestiones económicas, ecológicas o por la especificidad que las enzimas presentan. Sin embargo, muchas de las enzimas comercialmente disponibles no soportan las condiciones de reacción extremas que suelen presentar los procesos industriales. Una manera de resolver esa problemática es planteando la búsqueda de nuevos microorganismos extremófilos, los cuales son una fuente valiosa de nuevas enzimas.

En base a lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos para la realización de la presente tesis doctoral:

- Seleccionar entre cepas reportadas como queratinolíticas, el microorganismo no patógeno que exprese la mayor actividad queratinolítica utilizando residuo pelo como sustrato.



## *Introducción General*

- Estudiar las condiciones y medio de cultivo (para el microorganismo seleccionado) que maximicen la expresión de dichas enzimas a través de diseños estadísticos.
- Purificar y caracterizar la/s enzima/s producidas por el microorganismo (secuencia aminoacídica, características bioquímicas y cinéticas).
- Modelar cinéticamente la inactivación térmica de la enzima purificada y estudiar el efecto del agregado de ciertos agentes termoprotectores.
- Inmovilizar la queratinasa purificada sobre esferas de quitosano utilizando diferentes agentes entrecruzantes. Estudiar la condición que maximice el porcentaje de inmovilización y caracterizar del sistema obtenido, determinando las características bioquímicas y cinéticas de la enzima inmovilizada.
- Estudiar de las potenciales aplicaciones biotecnológicas del extracto enzimático producido. En este punto se incluyó el estudio de su aplicación como aditivo para detergentes comerciales, el estudio para la recuperación de metales pesados como la plata a partir de residuos radiográficos y en el área de la agricultura, el estudio de su potencial uso como promotor de crecimiento vegetal y para control biológico de cepas fitopatógenas.

**Bibliografía**

- Adetunji, C.O., Makanjuola, O.R., Arowora, K.A., Afolayan, S.S., and Adetunji, J.B. (2012) Production and application of keratin-based organic fertilizer from microbially hydrolyzed feathers to cowpea (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Scientific & Engineering Research* 3:1- 9
- Allpress, J.D., Mountain, G., and Gowland, P.C. (2002) Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9407. *Letters in Applied Microbiology* 34:342-
- Anbu, P., Gopinath, S.C., Hilda, A., Lakshmipriya, T., and Annadurai, G. (2007) Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology* 98:1298- 1303
- Bach, E., Daroit, D., Corrêa, A., and Brandelli, A. (2011) Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation* 22:1191- 1201
- Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R., and Seghal, P.K. (2008) Purification and characterization of an extracellular keratinase from hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2741- 2745
- Banik, R.M. & Prakash, M. (2004) Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research* 159:135- 140
- Barone, J.R., Schmidt, W.F., and Liebner, C.F. (2005) Thermally processed keratin films. *Journal of Applied Polymer Science* 97:1644- 1651
- Barone, J.R. & Arikan, O. (2007) Composting and biodegradation of thermally processed feather keratin polymer. *Polymer Degradation and Stability* 92:859- 867
- Beg, K. & Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidant-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32:294- 304
- Bernal, C., Cairó, J., and Coello, N. (2006) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:49- 54
- Bertsch, A. & Coello, N. (2005) A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology* 96:1703- 1708
- Böckle, B., Galunsky, B., and Müller, R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3705- 3710
- Bragulla, H.H. & Homberger, D.G. (2009) Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 214:516- 559

## *Introducción General*

- Brandelli, A. (2005) Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium sp.* *Annals of Microbiology* 55:47- 50
- Brandelli, A. (2008) Bacterial Keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol* 1:105- 116
- Brandelli, A., Daroit, D.J., and Riffel, A. (2010) Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1735- 1750
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2570- 2576
- Cai, C.G. & Zheng, X.D. (2009) Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:875- 883
- Cao, L., Tan, H., Liu, Y., Xue, X., and Zhou, S. (2008) Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Letters in Applied Microbiology* 46:389- 394
- Cao, Z.J., Zhang, Q., Wei, D.K., Chen, L., Wang, J., Zhang, X.Q., and Zhou, M.H. (2009) Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:181- 188
- Cavello, I., Cavalitto, S., and Hours, R. (2012) Biodegradation of a Keratin Waste and the Concomitant Production of Detergent Stable Serine Proteases from *Paecilomyces lilacinus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167:945- 958
- Cheng, S.H., Hu, H.M., and Shen, S.W. (1995) Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59:2239- 2243
- Chitte, R.R., Nalawade, V.K., and Dey, S. (1999) Keratinolytic activity from the broth of feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28:131- 136
- Choi, J.M. & Nelson, P. (1996) Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. Using poultry feathers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121:634- 638
- Elíades, L., Cabello, M., Voget, C.E., Galarza, B., and Saparrat, M. (2010) Screening for alkaline keratinolytic activity in fungi isolated from soils of the biosphere reserve "Parque Costero del Sur" ( Argentina ). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:2105- 2111
- Farag, A.M. & Hassan, M.A. (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34:85- 93
- Filipello Marchisio, V., Fusconi, A., and Querio, F.L. (2000) *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? *Mycoses* 43:281- 292

## *Introducción General*

- Forgács, G., Alinezhad, S., Mirabdollah, A., Feuk-Lagerstedt, E., and Horváth, I.S. (2011) Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. *Journal of Environmental Sciences* 23:1747- 1753
- Foroughi, F., Keshavarz, T., and Evans, C.S. (2006) Specificities of proteases for use in leather manufacture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81:257- 261
- Friedrich, A.B. & Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennovorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2875- 2882
- Friedrich, J. & Kern, S. (2003) Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21:35- 37
- Galarza, B., Cavello, I.A., Greco, C., Hours, R.A., Schuldt, M., and Cantera, C. (2010) Alternative technologies for adding value to bovine hair waste. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 94:26- 32
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, M.L., Reinoso, H.M., and Lopez, L.M.I. (2004) Fungal biotransformation of bovine hair part I: Isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 88:93- 98
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., and Mattiasson, B. (2003a) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology* 32:519- 524
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., and Mattiasson, B. (2003b) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology* 32:519- 524
- Ghosh, A., Chakrabarti, K., and Chattopadhyay, D. (2008) Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:825- 834
- Gioppo, N.M.R., Moreira-Gasparin, F.G., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., Souza, C.G.M., and Peralta, R.M. (2009) Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:705- 711
- Godfrey G (1996) Proteases in waste treatment. In: *Industrial Enzymology*, Godfrey G (ed) Macmillan Press Ltd, London, pp 315-316
- Gradišar, H., Friedrich, J., Krizaj, I., and Jerala, R. (2005) Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3420- 3426
- Gradišar, H., Kern, S., and Friedrich, J. (2000) Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:196- 200
- Gupta, R., Beg, K., and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:15- 32

## *Introducción General*

- Gupta, R. & Ramnani, P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview . *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21- 33
- Gupta, R., Sharma, R., and Beg, Q.K. (2013) Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 33:216- 228
- Gushterova, A., Vasileva-Tonkova, E., Dimova, E., Nedkov, P., and Haertl+®, T. (2005) Keratinase Production by Newly Isolated Antarctic Actinomycete Strains. *World J Microbiol Biotechnol* 21:831- 834
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2009) Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* 47:71- 79
- Ionata, E., Canganella, F., Bianconi, G., Benno, Y., Sakamoto, M., Capasso, A., Rossi, M., and La Cara, F. (2008) A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. *Microbiological Research* 163:105- 112
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., and Chang, C.S. (2004) Bleach-resistant alkaline protease produced by *Bacillus sp.* isolated from the Korean polychaeta, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry* 39:1441- 1447
- Khardenavis, A.A., Kapley, A., and Purohit, H.J. (2009) Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia sp.* HPC 1383. *Waste Management* 29:1409- 1415
- Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A., and Horikoshi, K. (2006) Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles* 10:229- 235
- Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P., and Briki, F. (2004) New Aspects of the  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Sheet Transition in Stretched Hard  $\alpha$ -Keratin Fibers. *Biophysical Journal* 87:640- 647
- Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., and Sekaran, G. (2008) Characterization of an alkaline active - thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology* 104:411- 419
- Kumar, C.G. & Takagi, H. (1999) Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17:561- 594
- Kumar, R., Balaji, S., Uma, T.S., Mandal, A.B., and Sehgal, P.K. (2010) Optimization of influential parameters for extracellular keratinase production by *Bacillus subtilis* (MTCC9102) in solid state fermentation using horn meal-a biowaste management. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:30- 39
- Kunert J (2000) Physiology of keratinophilic fungi. In: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Kushwaha RKS (ed) Revista Iberoamericana de Micologia, Bilbao, pp 77-85
- Kwon, Y., Kim, J., Moon, S., Lee, H., and Rho, H. (1994) Extracellular alkaline proteases from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Biotechnology Letters* 16:413- 418

## *Introducción General*

- Letourneau, Soussotte, Bressollier, Branland, and Verneuil (1998) Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Letters in Applied Microbiology* 26:77- 80
- Lin, X., Inglis, G.D., Yanke, L.J., and Cheng, K.J. (1999) Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23:149- 153
- Lin, X., Wong, S.L., Miller, E.S., and Shih, J.C.H. (1997) Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19:134- 138
- Longshaw, C.M., Wright, J.D., Farrell, A.M., and Holland, K.T. (2002) *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 93:810- 816
- Lucas, F.S., Broennimann, O., Febbraro, I., and Heeb, P. (2003) High Diversity among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil. *Microb Ecol* 45:282- 290
- Macedo, A.J., Beys da Silva, W.O., Gava, R., Driemeier, D., Pêgas Henriques, J.A., and Termignoni, C. (2005) Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:594-596
- Macedo, A.J., Silva, W.O., and Termignoni, C. (2008) Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Canadian Journal of Microbiology* 54:180- 188
- Malhotra, G.G. & Zatz, J.L. (2002) Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91:312- 323
- Marcondes, N.R., Taira, C.L., Vandresen, D.C., Svidzinski, T.I.E., Kadowaki, M.K., and Peralta, R.M. (2008) New Feather-Degrading Filamentous Fungi . *Microbial Ecology* 56:13- 17
- Mitsuiki, S., Ichikawa, M., Oka, T., Sakai, M., Moriyama, Y., Sameshima, Y., Goto, M., and Furukawa, K. (2004) Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardopsis* sp. TOA-1. *Enzyme and Microbial Technology* 34:482- 489
- Moallaei, H., Zaini, F., Larcher, G., Beucher, B., and Bouchara, J.P. (2006) Partial purification and characterization of a 37 KDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia* 161:369- 375
- Mohamedin, A.H. (1999) Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43:13- 21
- Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J., and Murdan, S. (2007) An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 332:196- 201

## *Introducción General*

- Moreira-Gasparin, F.G., Souza, C.G., Costa, M.A., Alezandrino, A.M., Bracht, C.K., Boer, C.G., and Peralta, R.M. (2009) Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation* 20:727- 736
- Murdan, S. (2002) Drug delivery to the nail following topical application. *International Journal of Pharmaceutics* 236:1- 26
- Nagal, S., Kango, N., and Jain, P. (2010) Production of alkaline protease from *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 using chicken feathers. *Annals of Microbiology* 60:629- 635
- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., and Pyun, Y.R. (2002) Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology* 178:538- 547
- Okoroma, E.A., Garelick, H., Abiola, O.O., and Purchase, D. (2012) Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. *International Biodeterioration & Biodegradation* 74:54- 60
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., and Al-Zarban, S. (1998) A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol* 66:1- 11
- Pillai, P. & Archana, G. (2008) Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:643- 650
- Poopathi, S. & Abidha, S. (2008) Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62:479- 482
- Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., and Sreeramulu, K. (2010) Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:625- 633
- Rai, S.K., Konwarh, R., and Mukherjee, A.K. (2009) Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline  $\beta$ -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochemical Engineering Journal* 45:218- 225
- Ramnani, P. & Gupta, R. (2007) Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1537- 1540
- 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* 62:597- 635
- Riessen, S. & Antranikian, G. (2001) Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov.; a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles* 5:399- 408

## *Introducción General*

- Riffel, A. & Brandelli, A. (2006) Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:395- 399
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., and Brandelli, A. (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology* 179:258- 265
- Sangali, S. & Brandelli, A. (2000) Feather keratin hydrolysis by *Vibrio sp.* strain kr2. *Journal of Applied Microbiology* 89:735- 743
- Santos, R.M., Firmino, A.A., de Sá, C.M., and Felix, C.R. (1996) Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus Fresenius* . *Current Microbiology* 33:364- 370
- Shankar, S., Rao, M.B., and Laxman, R. (2011) Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria sp.* *Process Biochemistry* 46:579- 585
- Singh, J., Vohra, R.M., and Sahoo, D.K. (1999) Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters* 21:921- 924
- Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., and Ramasubramanian, V. (2012) Plant growth promoting activity of nickel tolerant *Bacillus cereus* TS1. *Journal of Agricultural Technology* 8:2101- 2113
- Sun Y, Liu JC, Wang JC, and De Donker P (1999) Nail Penetration. Focus on topical delivery of antifungal drugs for onychomycosis treatment. In: *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Bronaugh RL (ed) 3rd. New York, pp 759-787
- Suntornsuk, W. & Suntornsuk, L. (2003) Feather degradation by *Bacillus sp.* FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology* 86:239- 243
- Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., and Watanabe, K. (2006) Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102:73- 81
- Syed, D.S., Lee, J., Li.W.L., Kim, C., and Agasar, D. (2009) Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology* 100:1868- 1871
- Szabó, I., Benedek, Á., Szabó, I.M., and Barabás, G. (2000) Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:253- 255
- Takahashi, K., Yamamoto, H., Yokote, Y., and Hattori, M. (2004) Thermal behavior of fowlfeather keratin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68:1875- 1881
- Takami, H., Akiba, T., and Horikoshi, K. (1989) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30:120- 124
- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M.T., Kolli, N., and Mangamoori, L.N. (2008) Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces sp.* *Bioresource Technology* 99:1596- 1602



## *Introducción General*

- Taylor, D.M. (2000) Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A Review. *The Veterinary Journal* 159:10- 17
- Thys, R.C.S. & Brandelli, A. (2006) Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of Applied Microbiology* 101:1259-1268
- Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P., and Brandelli, A. (2004) Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology* 39:181- 186
- Tsiroulnikov, K., Rezai, H., Bonch-Osmolovskaya, E., Nedkov, P., Gousterova, A., Cueff, V.r., Godfroy, A., Barbier, G., Métro, F., Chobert, J.M., Clayette, P., Dormont, D., Grosclaude, J., and Haertlé, T. (2004) Hydrolysis of the Amyloid Prion Protein and Nonpathogenic Meat and Bone Meal by Anaerobic Thermophilic Prokaryotes and *Streptomyces* Subspecies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6353- 6360
- Voet D and Voet JD (1995) *Biochemistry*. Wiley, New York, pp 141-152
- Wang, S.L., Hsu, W.T., Liang, T.W., Yen, Y.H., and Wang, C.L. (2008) Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Bioresource Technology* 99:5679- 5686
- Wang, X. & Parsons, C.M. (1997) Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Science* 76:491- 496
- Wawrzkiwicz, K., Wolski, T., and Lobarzewski, J. (1991) Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia* 114:1- 8
- Williams, C.M., Lee, C.G., Garlich, J.D., and Shih, J.C.H. (1991) Evaluation of a Bacterial Feather Fermentation Product, Feather-Lysate, as a Feed Protein. *Poultry Science* 70:85- 94



*Introducción General*

# *Capítulo 2*

## *Determinaciones Enzimáticas*



## *Técnica de medida de actividad proteolítica*

### **Introducción**

Existen una gran variedad de sustratos para la determinación de la actividad proteolítica de una enzima, entre ellos se encuentran los sustratos proteicos propiamente dichos que son proteínas o péptidos grandes de origen natural; los dipéptidos o tripéptidos con grupos cromogénicos o fluorogénicos y los péptidos sintéticos. El grupo de sustratos proteicos puede ser subdividido en subgrupos entre los cuales se encuentran las proteínas naturales como sustratos generales (caseína, albúmina bovina, gelatina y hemoglobina desnaturalizada); los derivados cromogénicos de las proteínas naturales (azocaseína, azoalbúmina y azogelatina); los derivados fluorogénicos de proteínas naturales (FITC-caseína) y proteínas específicas como, por ejemplo, colágeno como sustrato para colagenasas o elastina como sustrato para elastasas.

Los sustratos cromogénicos presentan la ventaja de tener una mayor sensibilidad y la posibilidad de efectuar las determinaciones de actividad enzimática en el espectro visible debido a que su hidrólisis enzimática produce la liberación de péptidos coloreados solubles, en el caso de las azoproteínas los péptidos liberados son de un color naranja intenso que absorben a 440 nm. Dentro de las azoproteínas, se prefiere el uso de azocaseína por sobre azoalbúmina por poseer éste último altos valores en sus blancos de reactivo. El sustrato azogelatina, en cambio, presenta por sobre los dos anteriores la ventaja de poder utilizarse en rangos de pH ácidos donde azocaseína y azoalbúmina son insolubles (Jones et al., 1998)

*Determinaciones enzimáticas*

*Sustratos  
usados para  
determinar  
actividad  
proteolítica*

*Sustratos proteicos (proteínas  
o péptidos grandes de origen  
natural)*

*Dipéptidos o tripéptidos con  
grupos cromogénicos o  
fluorogénicos*

*Sustratos sintéticos (péptidos  
cromogénicos o fluorogénicos)*

- 1- Proteínas naturales como sustratos generales
  - 2- Derivados cromogénicos de proteínas naturales (azoproteínas)
  - 3- Derivados fluorogénicos de proteínas naturales (FITC-caseína)
  - 4- Proteínas específicas
- 
- 1- Sustratos de endopeptidasas
  - 2- Sustratos de aminopeptidasas
  - 3- Sustratos de carboxipeptidasas

## *Determinaciones enzimáticas*

En el presente trabajo de tesis se eligió como sustrato de trabajo para las medidas de actividad proteolítica el sustrato azocaseína el cual se sintetizó siguiendo la técnica de Charney & Tomarelli (1947). El hecho de sintetizar el sustrato en el laboratorio trae aparejada la necesidad de validación y control del sustrato, así como la puesta a punto de la técnica de medida de actividad.

## **Materiales y métodos**

### ***Preparación del sustrato azocaseína***

Se preparó una solución 50 g/l de caseína grado Hammersten en una solución de carbonato de sodio al 1% p/v (solución A). Por otro lado (solución B) se disolvió – en baño de agua-hielo – 5 gr de ácido sulfanílico en una solución 0.15 N de hidróxido de sodio. Luego de la disolución completa del ácido sulfanílico se agregaron 2.20 g de nitrito de sodio y se continuó agitando para luego agregar 18 ml de una solución de ácido clorhídrico 5 N. Luego de 2 minutos se agregó igual volumen de una solución de hidróxido de sodio 5 N. Manteniendo ambas soluciones en baño de agua-hielo, se agregó lentamente la solución B sobre la solución A. La mezcla obtenida se continuó agitando en baño de agua-hielo por aproximadamente 30 minutos. La azoproteína sintetizada se precipitó luego por acidificación de la solución resultante con ácido tricloroacético al 10 % p/v. El precipitado se filtró y se lavó varias veces con agua destilada hasta que la solución de lavado presentó una absorbancia a 440 nm menor a 0.01. El sustrato se secó por liofilización.

### ***Obtención del extracto enzimático con actividad proteolítica***

Para la puesta a punto de la técnica de medida de la actividad proteolítica se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 cosechado al 5<sup>to</sup> día de cultivo con 10 g/l de residuo pelo como sustrato queratínico.

### ***Medida de la actividad azocaseinolítica***

Para la medida de actividad proteolítica se tomó como punto de partida la técnica descrita por Liggieri et al. (2004) a la cual se le realizaron algunas pequeñas modificaciones como el volumen de enzima utilizada, el pH de la mezcla de reacción y la temperatura de incubación, los últimos dos parámetros relacionados de alguna forma con la naturaleza de la enzima en estudio, en tanto que el primero de ellos está relacionado con evitar una dilución innecesaria del sustrato. A 0.25 ml de una solución de azocaseína al 1 % p/v en Buffer Tris-HCl (BT) 0.1M-pH 9.0 se le agregan 0.1 ml del



## *Determinaciones enzimáticas*

extracto enzimático convenientemente diluido. Luego de 30 minutos de incubación en baño termostático a 37 °C, la mezcla de reacción se detiene por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA, 10 % p/v). Luego de 15 minutos de reposo, para favorecer la precipitación del sustrato no hidrolizado, se centrifuga por 15 minutos a 5000 g. A 1 ml del sobrenadante se le adiciona 1 ml de una solución de NaOH 1 N y se mide absorbancia a 440 nm. Las determinaciones de medida de actividad proteolítica se realizaron por triplicado y en todos los casos se realizó un blanco de reactivos y muestra que fue preparado agregando TCA antes del agregado de la enzima.

Se define la unidad de actividad enzimática (U azoc/ml) como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.1 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto en las condiciones de reacción.

### ***Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad proteolítica - Ensayo de linealidad***

En la técnica de medida de actividad proteolítica se decidió conservar las condiciones de concentración de sustrato (solución de azocaseína al 1 % p/v en BT 0.1M-pH 9.0) y el tiempo de incubación (30 min) reportadas en bibliografía y determinar hasta qué concentración de enzima era posible medir con el método sin que deje de ser lineal la liberación de péptidos coloreados en función del tiempo. Es decir, definir hasta qué concentración de enzima en el tubo de reacción se cumple la condición de velocidad inicial. Para la realización de este estudio se agregaron diferentes cantidades del extracto enzimático al tubo de reacción (expresado como  $\mu$ l de enzima) y se procedió a medir la actividad enzimática como se explicó en el inciso anterior. La cantidad de extracto enzimático varió entre 5-100  $\mu$ l, utilizando BT para completar el volumen final de 0.1ml.

### ***Relación entre el sustrato azocaseína comercial y el sustrato sintetizado en laboratorio***

A fin de obtener un factor de conversión entre la actividad obtenida con la azocaseína comercial (Azocaseína Sigma A-2765) y la que fue preparada en el

### *Determinaciones enzimáticas*

laboratorio, se midieron ambas actividades para diferentes cantidades de enzima. Empleando la técnica de medida de actividad descrita anteriormente se midió la actividad del extracto enzimático de *P. lilacinum* utilizando cada uno de los sustratos y luego se compararon los valores obtenidos en cada caso, pudiéndose definir un factor de conversión que, aplicado en el valor de actividad proteolítica nos permitiera poder realizar comparaciones entre nuestros valores y los valores obtenidos por otros autores

## Resultados y discusión

### *Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad proteolítica - Ensayo de linealidad*

Con las condiciones de tiempo, temperatura y cantidad de sustrato prefijadas sólo fue necesario el estudio de la variación de la cantidad de extracto enzimático agregado al tubo de reacción con el fin de determinar cuál era la cantidad máxima de enzima que podía ser agregada sin salir de las condiciones de sustrato saturante. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

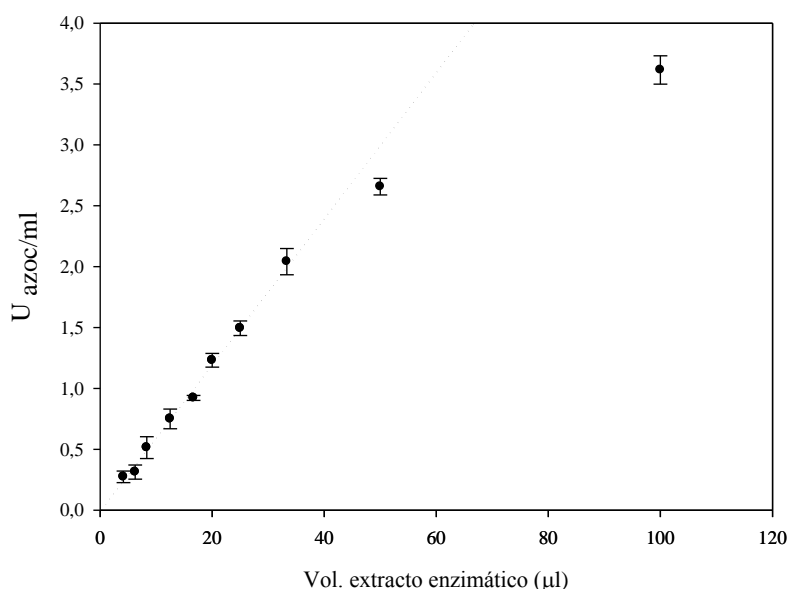


Figura 1. Unidades de actividad azocaseinolíticas ( $U_{\text{azoc/ml}}$ ) luego de 30 min de incubación a 37 °C en función de la cantidad de enzima agregada al tubo de reacción ( $\mu\text{l}$ ) con una concentración de azocaseína de 1% p/v en BT.

Se puede observar que la relación enzima agregada /  $U_{\text{azoc/ml}}$  se mantiene lineal hasta aproximadamente 2.04 unidades en el tubo de reacción (33.3  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático).

Con los resultados obtenidos en este estudio se proponen las siguientes condiciones para la medida de la actividad proteolítica:

- Sustrato: azocaseína 1 % p/v en BT 0.1M, pH 9.0

## *Determinaciones enzimáticas*

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura: 37 °C
- 100 µl de extracto enzimático convenientemente diluído de manera tal que no se agreguen más de 2.04 unidades en el tubo de reacción.

Generalmente, cuando se mide la actividad enzimática de diferentes muestras el sustrato se mantiene termostatizado a la temperatura de trabajo y sobre éste se va agregando la muestra de enzima a intervalos regulares de tiempo y, al finalizar el tiempo de incubación para cada muestra, se detiene la misma también a intervalos regulares de tiempo, ya sea por el agregado de algún reactivo (en nuestro caso TCA 10 % p/v) o por un cambio de temperatura. Utilizar este método cuando hay que manejar un gran número de muestras resulta bastante complicado en cuanto a la programación de los tiempos de agregado de la enzima. A fin de evitar este inconveniente se decidió probar el siguiente método. Se colocaron 0.25 ml del sustrato en cada tubo a utilizar y se sumergieron dichos tubos en un baño de agua-hielo. En cada uno de los tubos, se adicionan 0.1 ml del extracto enzimático a analizar, convenientemente diluido. A tiempo cero, se transfirieron todos los tubos a un baño termostático a 37 °C durante 30 minutos cuidando de agitar por unos segundos las muestras al inicio de la reacción con el fin de acelerar la transferencia de calor. Transcurrido el tiempo de medida, se volvieron a colocar las muestras al baño de agua-hielo donde nuevamente se agitaron por unos segundos las muestras y se procedió al agregado de 1 ml de TCA (10 % p/v). Para el caso de los blancos de reacción, 1 ml de TCA fue agregado antes del agregado de la enzima.

Esta técnica fue contrastada contra la técnica original utilizando diferentes volúmenes del extracto enzimático. En las condiciones de medida propuestas, se obtuvieron valores de actividad enzimática muy similares entre ambos protocolos (Figura 2). Todas las muestras fueron tratadas por triplicado. La técnica colorimétrica fue idéntica para ambos métodos.

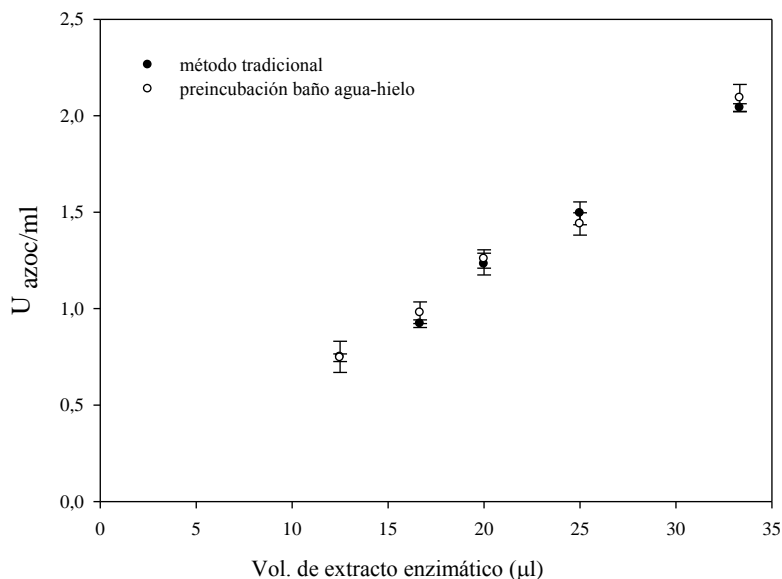


Figura 2. Actividad comparativa utilizando el método tradicional de medida (●) y el método con preincubación en baño agua-hielo (○) con 30 minutos de incubación

***Relación entre el sustrato azocaseína comercial y el sustrato sintetizado en laboratorio***

Una vez definido el protocolo de medida de la actividad proteolítica se procedió a validar el sustrato sintetizado en el laboratorio. Para ello, se determinó la actividad enzimática del extracto enzimático de *P. lilacinum* convenientemente diluido utilizando como sustrato soluciones de la azocaseína sintetizada en el laboratorio y la azocaseína marca SIGMA (0.250 ml de azocaseína al 1 % p/v por tubo) y siguiendo el protocolo detallado anteriormente. Puede observarse en la Tabla 1 que los valores obtenidos cuando se usaron ambos sustratos son similares por lo que, durante el resto de la tesis, se utilizó el sustrato sintetizado en el laboratorio

Tabla 1. Comparación entre Unidades proteolíticas utilizando ambos sustratos

Azocaseína casera (U/ml)	Azocaseína comercial (U/ml)	Relación azoc <sub>com</sub> /azoc <sub>cas</sub>
1.2604	1.2523	0.993
1.2093	1.2373	1.023
1.2232	1.2343	1.009

## **Bibliografía**

- Charney, J. & Tomarelli, R.M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry* 171:501-505
- Jones, B.L., Fontanini, D., Jarvinen, M., and Pekkarinen, A. (1998) Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin. *Analytical Biochemistry* 263:214- 220
- Liggieri, C., Arribére, M.C., Trejo, S., Canals, F., Avilés, F., and Priolo, N. (2004) Purification and Biochemical Characterization of Asclepain c I from the Latex of *Asclepias curassavica* L. *The Protein Journal* 23:403- 411

## *Técnica de medida de actividad queratinolítica*

### **Introducción**

La gran variedad de sustratos disponibles para medir la actividad queratinolítica, así como el uso de una gran cantidad de definiciones de unidades enzimáticas, traen aparejada la dificultad de poder comparar la actividad queratinolítica de estas enzimas entre sí. Como puede observarse en la Tabla 2, la mayoría de los sustratos disponibles para la medida de esta actividad son insolubles (azul de queratina, polvo de queratina, pelo humano o de cerdo, azoqueratina, etc.). Para el caso particular de esta tesis doctoral, como sustrato para la medida de la actividad queratinolítica se seleccionó el sustrato azoqueratina, el cual fue sintetizado a partir de harina de plumas. La hidrólisis enzimática de este sustrato pertenece al grupo de reacciones de naturaleza heterogéneas y presenta una serie de particularidades que las reacciones homogéneas no presentan, tal como el efecto de la adsorción de la enzima sobre el sustrato (McLaren & Packer, 1970).

Los autores que emplean el sustrato azoqueratina para la medida de actividad queratinolítica utilizan como fuente de queratina plumas molidas y, a pesar de utilizar todos ellos el mismo sustrato, cada uno de ha definido de manera diferente a la unidad de actividad enzimática (Lin et al., 1992; Evans et al., 2000a; Sangali & Brandelli, 2000b; Kim et al., 2001; De Toni et al., 2002). Por esta razón, al utilizar otra fuente de queratina -harina de plumas- para la síntesis del sustrato y la consecuente medida de actividad, resultó necesario poner a punto la técnica de medida de actividad enzimática y definir una serie de condiciones, tanto de sustrato como de enzima, que permitieran que esta técnica sea de utilidad para la medida de la actividad de los cultivos.

*Determinaciones enzimáticas*

Tabla 2. Actividad queratinolítica: Definición de unidad enzimática y sustratos queratínicos

Definición	Sustrato	Referencias
<b><u>Unidades azoqueratina</u></b>		
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de abs. a 450 nm luego de 15 min de incubación	Azoqueratina	Lin et al., (1992); Riffel et al., (2003)
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de abs. a 450 nm por min a la temperatura óptima	Azoqueratina	Lin et al., (1999); Evans et al., (2000b)
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de abs. a 440 nm luego de 15 min de incubación a 50 °C	Azoqueratina	Sangali & Brandelli (2000a)
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.001 unidades de abs. a 450 nm por hora a la temperatura óptima	Azoqueratina	Kim et al., (2001)
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de abs. a 420 nm luego de 30 min de incubación a 45 °C	Azoqueratina	Thys et al., (2004)
<b><u>Unidades azul de queratina</u></b>		
Cant. de enzima que produce un incremento de 1 unidad de abs. a 595 nm luego de 3 h de incubación	Azul de queratina	Santos et al., (1996)
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.1 unidades de abs. a 595 nm por hora	Azul de queratina	Letourneau et al., (1998); Suntornsuk & Suntornsuk, (2003)



*Determinaciones enzimáticas*

---

Cant. de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de abs. a 595 nm por hora	Azul de queratina	Bressollier et al., (1999); Bernal et al., (2003)
<b><u>Misceláneas</u></b>		
Cant. de enzima que produce un incremento de 0.1 unidades de abs. a 280 nm	Polvo de queratina (extracto córneo humano)	Gradišar et al., (2005)
Cant. de enzima que produce la liberación de 1 $\mu$ mol de leucina por hora a 570 nm	Harina de pluma	De Azaredo et al., (2006)
Cant. de enzima que produce un incremento en la abs. de 0.01 unidades a 680 nm luego de 1 hora de incubación	Polvo de piel humana	Xie et al., (2009)
Cant. de enzima que produce un incremento en la abs. de 0.1 unidades a 280 nm	Pelo de cerdo de Guinea	Muhsin & Aubaid, (2001)
Cant. de enzima que produce un incremento en la abs. de 0.01 unidades a 280 nm por minuto	Queratina soluble (plumas)	Nam et al., (2002)
Cant. de enzima que produce la liberación de 354 $\mu$ g de tirosina a 584 nm	Plumas	Chitte et al., (1999)
Cant. de enzima que produce la liberación de 1 $\mu$ g de tirosina a 275 nm	Queratina en polvo (plumas)	Pissuwan & Swaminathan, (2001)

---

## **Materiales y métodos**

### ***Preparación del sustrato azoqueratina***

Para la síntesis del sustrato azoqueratina se utilizó como material queratínico harina de plumas provista gentilmente por Willmor Bioindustrias. La misma fue desgrasada utilizando diclorometano como solvente y diazotada siguiendo la técnica de Charney & Tomarelli (1947). La solución de diazotación (Para 1 g de harina de pluma) se preparó siguiendo el siguiente protocolo: en un baño agua-hielo se disolvieron 0.174 g de ácido sulfanílico en 5 ml de una solución 0.2N de hidróxido de sodio y se agregaron 0.069 g de nitrito de sodio. La solución resultante se acidificó con 0.4 ml de ácido clorhídrico 5 N y se mezcló con agitación por 2 minutos para ser finalmente neutralizada con 0.4 ml de hidróxido de sodio 5 N. Esta solución de ácido sulfanílico diazotado fue lentamente vertida sobre la suspensión de harina de pluma, manteniendo la mezcla en baño de agua-hielo. Se continuó mezclando con agitación durante 10 minutos y luego la mezcla se filtró y el sustrato obtenido fue lavado con agua destilada varias veces. El ciclo de lavado se repitió hasta que la absorbancia del agua de lavado medida a 440 nm fuera menor a 0.01. Luego de los ciclos de lavado con agua destilada, el sustrato se lavo 2 veces con buffer BT (Buffer Tris-HCl 0.1M pH 9.0) para finalmente ser lavado con agua destilada y secado por liofilización.

### ***Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica***

Para la puesta a punto de la técnica de medida de la actividad queratinolítica se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 cosechado al 5<sup>to</sup> día de cultivo con 10 g/l de residuo pelo como sustrato queratínico.

### ***Medida de la actividad queratinolítica***

Para la medida de actividad queratinolítica se colocó el sustrato seco en tubos de base plana junto con 0.8 ml de BT. La mezcla se agitó por 15 minutos en baño de agua-hielo, utilizando un agitador sumergible multipunto Thermo-Variomag® a fin de que el sustrato quede completamente suspendido. Transcurrido ese tiempo se adicionó a cada

## *Determinaciones enzimáticas*

tubo 0.1 ml de la muestra de extracto enzimático convenientemente diluida. A tiempo cero, los tubos (junto con el agitador) se transfirieron a un baño termostático a 37 °C y 100 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo por el agregado de 0.2 ml de ácido tricloroacético (TCA, 10 % p/v). Luego del agregado del TCA, la mezcla se dejó reposar por 15 minutos, se centrifugó por 15 minutos a 5000 g y se midió la absorbancia del sobrenadante a 440 nm. Las determinaciones de medida de actividad queratinolítica se realizaron por triplicado y en todos los casos se realizó un blanco de reactivos y muestra que fue preparado agregando TCA antes del agregado de la enzima.

Se definió la unidad de actividad enzimática (U azoq/ml) como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto en las condiciones de reacción.

### ***Efecto del tamaño de partícula en la medida de actividad queratinolítica***

Debido a la gran dispersión de tamaños del sustrato sintetizado, y ante la sospecha de que esta dispersión pudiera causar dispersión en la medida de actividad enzimática, se procedió a tamizar el mismo por una serie de tamices de Mesh 18, 35 y 140, respectivamente, obteniéndose 2 fracciones distintas. Se denominó fracción de partículas grandes a la fracción de sustrato que pasó por el tamiz de Mesh 18 y quedó retenido en el tamiz de Mesh 35 ( $1000 \mu\text{m} > \emptyset > 500 \mu\text{m}$ ) y fracción de partículas pequeñas a la que pasó por el tamiz de Mesh 35 y quedó retenido en el tamiz de Mesh 140 ( $500 \mu\text{m} > \emptyset > 100 \mu\text{m}$ ).

En esta primera experiencia se midió la actividad queratinolítica colocando una cantidad arbitraria de sustrato fija de 20 mg, 0.1 ml del extracto enzimático diluido 1:6 y se dejó reaccionar por un tiempo fijo de 30 minutos.

### ***Efecto de la concentración de sustrato en la medida de actividad queratinolítica***

A los efectos de estudiar la relación entre área de sustrato expuesta a la enzima y actividad enzimática, se estudió el efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. En esta experiencia se utilizaron las dos fracciones de

## *Determinaciones enzimáticas*

sustrato (partículas grandes y pequeñas) y se midió la actividad queratinolítica en un rango de concentraciones de sustrato de 5-35 mg bajo las mismas condiciones de medidas del inciso anterior (0.1 ml del extracto enzimático diluido 1:6, tiempo: 30 min, 37 °C.)

### ***Efecto de la disminución del tamaño de partícula a concentración de sustrato fija en la medida de actividad queratinolítica***

A fin de estudiar el efecto del área expuesta del sustrato sin modificar la cantidad del mismo se profundizó el estudio del efecto del tamaño de partícula sobre la actividad, aumentando el número de fracciones estudiadas. Se nombró a cada fracción con el número de tamiz que las hubiera retenido, 18 ( $\emptyset > 1000 \mu\text{m}$ ), 35 ( $1000 \mu\text{m} > \emptyset > 500 \mu\text{m}$ ), 50 ( $500 \mu\text{m} > \emptyset > 300 \mu\text{m}$ ), 60 ( $300 \mu\text{m} > \emptyset > 250 \mu\text{m}$ ), 70 ( $250 \mu\text{m} > \emptyset > 210 \mu\text{m}$ ) y 140 ( $210 \mu\text{m} > \emptyset > 100 \mu\text{m}$ ). Las condiciones de medida de actividad fueron las mismas que las utilizadas en el apartado anterior, con una concentración de sustrato fija en 30 mg.

### ***Efecto del tiempo de reacción en la medida de actividad queratinolítica***

Luego de establecer el tamaño de partícula y la concentración de sustrato para la medida de actividad, la siguiente variable que se estudió fue el tiempo de incubación. El rango de tiempo de incubación estudiado fue de 5 a 60 minutos.

### ***Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad queratinolítica***

Con las condiciones de concentración de sustrato y tiempo de incubación fijas, y con el fin de conocer el rango de validez de la medida de actividad, es decir el rango en el cual existe una relación lineal entre la cantidad de enzima agregada y el producto generado, se procedió a estudiar el efecto de la concentración de la enzima (expresada como  $\mu\text{l}$  de enzima adicionada al tubo de reacción) en la medida de actividad enzimática. La cantidad de enzima adicionada varió entre 5-100  $\mu\text{l}$ , utilizando BT para completar el volumen final de 0.1ml.

### ***Especificidad del sustrato azoqueratina***

Con el objetivo de estudiar la especificidad del sustrato azoqueratina se estudió la actividad de diferentes proteasas frente a este sustrato y frente a azocaseína. Se utilizó, como medida de la capacidad queratinolítica, la relación entre la velocidad de hidrólisis del sustrato azoqueratina y el sustrato azocaseína. Una relación entre la velocidad de hidrólisis del sustrato azoqueratina y el sustrato azocaseína mayor a 5 (Q:C > 5) diferencia a una queratinasa de una proteasa típica. De la misma manera, se podría definir que un sustrato es específico para la medida de la actividad queratinolítica si puede ser hidrolizado por ciertas proteasas (queratinasas) y no ser hidrolizado por otras proteasas; en otras palabras si la relación de hidrólisis entre el sustrato a estudiar y el sustrato azocaseína (Q:C) es mayor a 5 (Brandelli, 2005).

Para el estudio de la especificidad de sustrato se utilizaron ciertas proteasas comerciales: Proteinasa K (Promega), Alcamax (Cergen) y Papaína (Fluka). De todas ellas se prepararon soluciones stock de 1mg/ml en BT y fueron luego diluidas convenientemente para la determinación de ambas actividades enzimáticas. Para cada una de ellas se determinó la relación Q:C.

## Resultados y discusión

### *Efecto del tamaño de partícula en la medida de actividad queratinolítica*

La azoqueratina, luego de su síntesis, presentó una gran dispersión de tamaño de partícula, razón por la cual se procedió a tamizar el sustrato a través de una serie de tamices de Mesh 18, 35 y 140, obteniéndose cuatro fracciones de las cuales, por su cantidad, se seleccionaron dos que se denominaron fracciones de partículas grandes y pequeñas. Se observó que, en iguales condiciones de reacción, la actividad obtenida con las partículas grandes fue menor que la obtenida con las partículas pequeñas (Figura 3). El resultado obtenido en esta experiencia es un resultado esperado para cualquier reacción enzimática de tipo heterogénea. Estas reacciones dependen del área del sustrato expuesta a la enzima más que de la cantidad de sustrato utilizado (Mc.Laren & Packer, 1970). Así, a igual cantidad de sustrato, la superficie de contacto entre la enzima y su sustrato es mayor cuanto menor es el tamaño de la partícula.

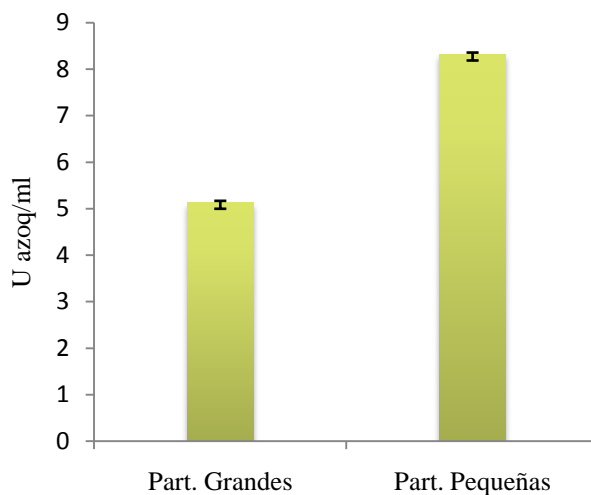


Figura 3. U azoq/ml producidas por una misma cantidad de extracto enzimático utilizando fracciones de sustratos que diferían en el tamaño de partícula (20 mg por tubo)

### *Efecto de la concentración de sustrato en la medida de actividad queratinolítica*

Una vez confirmado el hecho de que el área es un factor importante en la medida de actividad queratinolítica, y que ésta es directamente proporcional al valor obtenido

### *Determinaciones enzimáticas*

de actividad se plantearon dos estrategias alternativas para aumentar el área superficial expuesta al extracto enzimático. La primera estrategia fue aumentar la cantidad de sustrato manteniendo constantes el volumen de trabajo (buffer y enzima). La cantidad de sustrato en el tubo varió de 5 a 35 mg. El resultado obtenido para ésta primera estrategia se muestra en la Figura 4 en donde se puede observar que la actividad aumenta junto con la cantidad de sustrato, presentando un nivel de saturación. Se sigue observando que cuando se mide actividad utilizando la fracción de partículas pequeñas ésta es mayor que cuando se mide actividad con las partículas grandes. El-Refai et al. (2005) reportan un comportamiento semejante en la caracterización de un extracto enzimático producido por *Bacillus pumilis* FH9 creciendo con plumas como sustrato. Asimismo, el estudio del comportamiento de la actividad enzimática en función de la cantidad y tamaño del sustrato ha sido reportado para otros sustratos como paja de trigo (Estrada et al., 1988) y albedo de limón (Cavalitto et al., 1997). En ambos trabajos se ve cómo al aumentar la cantidad de sustrato la actividad enzimática aumenta y es aún mayor cuando el sustrato fue previamente tamizado.

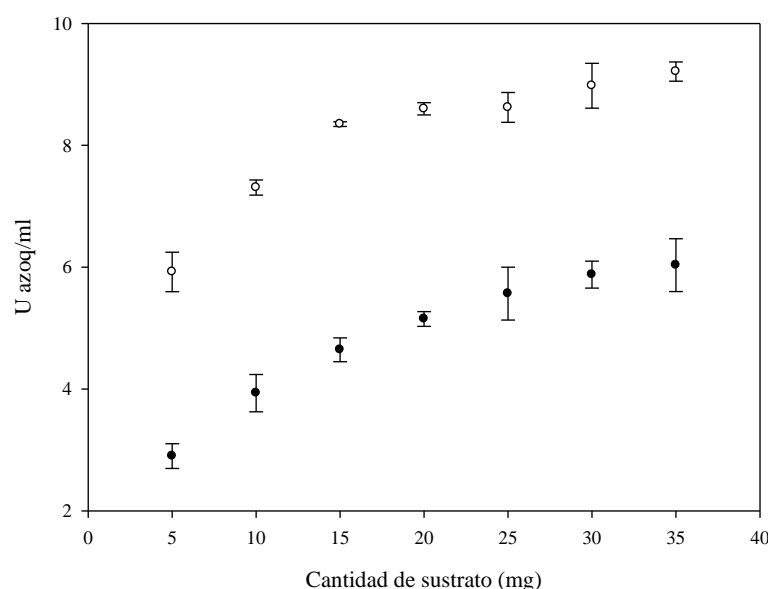


Figura 4. U azoq/ml en el tubo de reacción para una misma cantidad de extracto enzimático ( $\mu$ l) con diferentes cantidades de sustrato (mg). Partículas grandes (●) y partículas pequeñas (○)

***Efecto de la disminución del tamaño de partícula a concentración de sustrato fija en la medida de actividad queratinolítica***

Uno de los inconvenientes que presenta esta primera estrategia es que a mayor cantidad de sustrato existe la posibilidad de que las partículas absorban mayor cantidad de buffer y que la disminución de la fase líquida produzca una concentración de la solución con respecto a una solución con menor cantidad de sustrato y esto pueda modificar el valor de actividad medida. Para evitar este inconveniente y como segunda estrategia para aumentar el área expuesta al extracto enzimático, se planteó la posibilidad de disminuir el tamaño de la partícula manteniendo la cantidad de sustrato fija. En esta experiencia, la fracción de partículas pequeñas se volvió a pasar por una serie de tamices de mayor Mesh y cada una de las fracciones obtenidas fue nombrada de acuerdo al número de Mesh del tamiz que las retuvo. Las fracciones obtenidas y ensayadas fueron 35, 50, 60, 70 y 140. La fracción de partículas grandes (Mesh 18) también fue ensayada. Los resultados obtenidos en esta experiencia demuestran que para una cantidad fija de sustrato a medida que el tamaño de partícula disminuye la actividad aumenta, llegando a un punto donde el área se hace saturante (partículas menores que las retenidas por tamices de Mesh 70) y no se encuentra diferencia significativa entre la actividad enzimática entre un tamaño y otro (Figura 5).

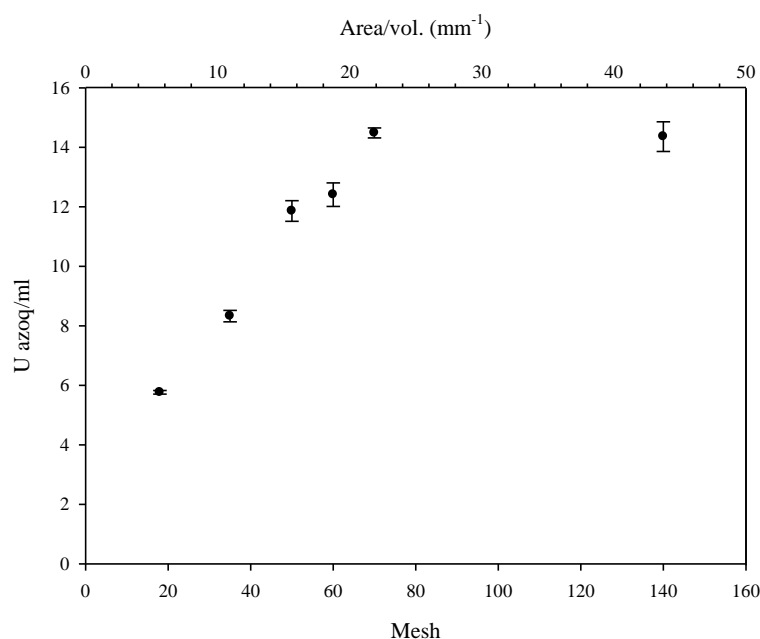


Figura 5. U azoq/ml en el tubo de reacción para una misma cantidad de extracto enzimático ( $\mu$ l) y de sustrato (30 mg) variando el tamaño de partícula



## *Determinaciones enzimáticas*

Con este experimento se confirma el hecho de que lo importante en las reacciones heterogéneas es lo que la enzima “ve” del sustrato y no directamente la cantidad de éste que se encuentra presente en el medio. Si se supone que las partículas de sustrato son esferas cuyo diámetro está dado por el tamaño de la malla del tamiz más pequeño que puede atravesar, se puede calcular la relación entre el área superficial y el volumen de las mismas (Goldberger & Robbins, 1984). La curva de la Figura 5 puede ser dividida en dos regiones. La primera región corresponde a las fracciones de sustrato que tienen un área superficial total insuficiente para saturar la cantidad de enzima utilizada (es la superficie disponible del sustrato quien limita la velocidad de reacción). La segunda región de la curva corresponde a aquellas fracciones de sustrato que tienen una relación área/volumen mayor en donde ahora el área superficial total satura la cantidad de enzima (enzima limitante de velocidad de reacción). Este comportamiento podría ser explicado asumiendo que la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida, y que el fenómeno de absorción sigue el modelo de una isoterma Langmuir (McLaren & Packer, 1970). Es interesante observar que en la primera región de la curva, la velocidad de reacción es proporcional al área externa de superficie por unidad de volumen. Este hecho sugiere que, en este caso, sólo la superficie externa del sustrato está disponible para la enzima. Cavalitto et al. (1997), así como Burns et al. (1989) han reportado en sendos trabajos que la acción de Pectinasa SE sobre protopectina así como la acción de celulasas de *Trichoderma reesei* sobre pulpa de madera, ocurren también sobre la superficie más externa del sustrato estudiado.

La fracción de sustrato denominada Mesh 70 fue seleccionada para los ensayos siguientes por ser esta fracción perteneciente a la segunda región de la curva y por ser una de las fracciones obtenidas más abundantes al momento de la preparación del sustrato. La cantidad de sustrato se fijó en 30 mg.

### ***Efecto del tiempo de reacción en la medida de actividad queratinolítica***

Con las variables tamaño de partícula y cantidad de sustrato fijas, se estudió el tiempo de incubación en el que la velocidad de reacción se considera “inicial”. El rango de tiempo de incubación estudiado fue de 5 a 60 minutos. Se puede observar (Figura 6) que, bajo las condiciones de medida, la actividad enzimática se mantuvo proporcional al

## *Determinaciones enzimáticas*

tiempo hasta los 40 minutos de reacción. Por razones de practicidad se eligió un tiempo de reacción de 25 minutos como medida en el tiempo estándar, pudiendo ser éste alargado sin inconvenientes si la cantidad de enzima es menor a la utilizada para estos ensayos.

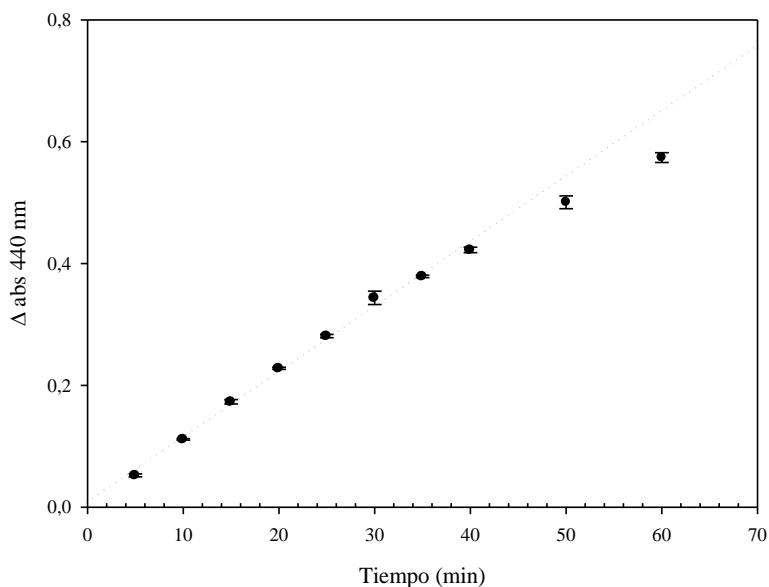


Figura 6.  $\Delta$ abs 440 nm producido por una determinada cantidad de extracto enzimático en función del tiempo, utilizando 30 mg de sustrato retenido por un tamiz de Mesh 70.

### ***Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad queratinolítica***

Como último paso en la puesta a punto de la medida de actividad queratinolítica se estudió la linealidad de la medida de actividad variando la cantidad de enzima agregada ( $\mu$ l de extracto enzimático). La cantidad de enzima adicionada varió entre 5-100  $\mu$ l, utilizando BT para completar el volumen final de 0.1ml. Puede observarse en la Figura 7 que la relación enzima agregada/act. azoqueratinolítica se mantiene lineal hasta aproximadamente un volumen de 25  $\mu$ l de extracto enzimático (que es equivalente a 10 unidades en el tubo de reacción).

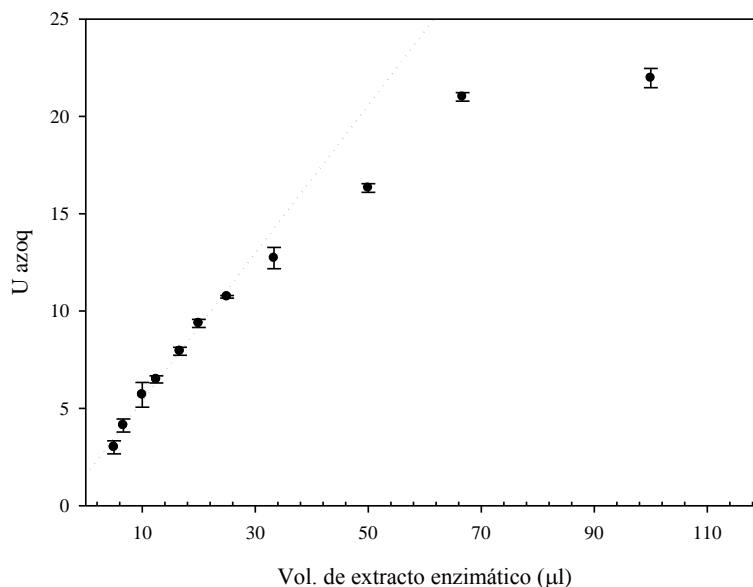


Figura 7. Relación entre actividad recuperada y cantidad de enzima agregada (µl)

De acuerdo con los resultados anteriores, se propone el uso de 30 mg de azoqueratina (mesh 70) como sustrato, 800 µl de BT, 100 µl del extracto enzimático convenientemente diluido y un tiempo de reacción de 25 min para la evaluación de la actividad queratinolítica. Bajo estas condiciones de reacción, una unidad de actividad azoqueratinolítica se define como la cantidad de enzima que produce un aumento en la absorbancia de 0.01 a 440 nm por minuto a 37 °C. Teniendo en cuenta que la máxima cantidad de actividad enzimática añadida al tubo de ensayo debe no exceder de 10 unidades.

### ***Especificidad del sustrato azoqueratina***

Una vez establecidas las condiciones de medida de actividad queratinolítica se procedió a estudiar la especificidad del sustrato. Así, además del extracto enzimático de *P. lilacinum*, se utilizaron las siguientes proteasas comerciales: Proteinasa K (Promega), Proteasa de *Streptomyces griseus* (Sigma), Alcamax (Cergen) y Papaína (Fluka). De todas ellas se prepararon soluciones stock de 1mg/ml en BT y fueron luego diluidas convenientemente para la determinación de actividad proteolítica y queratinolítica. Para cada una de estas proteasas se determinó la relación entre la velocidad de hidrólisis del

*Determinaciones enzimáticas*

sustrato azoqueratina y el sustrato azocaseína (relación Q:C). En la Tabla 3 se muestra el grado de hidrólisis para los sustratos azoqueratina y azocaseína, en términos de actividad específica, y la razón queratina/caseína (Q/C). Se puede observar que tanto el extracto enzimático como Proteinasa K y Alcamax son las proteasas que tienen una relación Q/C mayor a 5 y las enzimas Protease from *Streptomyces griseus* y Papaína tienen una relación Q/C menor a 5. Al existir al menos una proteasa que presente una relación Q/C menor a 5 hace que el sustrato azoqueratina pueda ser catalogado como un sustrato específico para queratinasas.

Tabla 3. Grado de hidrólisis de los sustratos azocaseína y azoqueratina, en términos de actividad específica, y la razón queratina/caseína (Q/C).

	Actividad azocaseinolítica (U/mg)	Actividad azoqueratinolítica	Relación Q/C
Extracto enzimático	15.67	159.3	10.17
Proteinasa K	33.9	218.7	6.45
Proteasa	40.1	94.93	2.37
Alcamax	4.6	27.4	5.96
Papaína	7.6	3.9	0.51

Resumiendo, teniendo cuidado de mantener todas las precauciones en la medida de actividad se puede concluir que esta técnica posee una confiabilidad satisfactoria en cuanto a que realmente lo que se mide es actividad contra queratina. Sin embargo existen ciertos detalles que no deben ser pasados por alto:

- Es una técnica engorrosa cuando se deben manejar grandes volúmenes de muestras.
- Tanto este sustrato como el sustrato azul de queratina provisto por la marca Sigma varían entre lotes. Esto se traduce en la posibilidad de que la actividad enzimática varié al cambiar de lote del sustrato (o el lote de harina de pluma).

Debido a esto, se decidió, siempre que fuera posible, utilizar como técnica de rutina la medida de actividad proteolítica sobre el sustrato azocaseína. La medida de

## *Determinaciones enzimáticas*

actividad azoqueratina se utilizó para confirmar hechos tales como que *P. lilacinum* realmente producía queratinasas, el curso de la producción enzimática a lo largo del tiempo, que la queratinasa purificada realmente era una queratinasa y no alguna otra proteasa producida por el hongo, etc. A su vez, en los capítulos posteriores de la tesis se demostrará el hecho de que la existencia de una relación Q/C constante a lo largo del cultivo nos permite utilizar la actividad proteolítica como medida indirecta de la actividad queratinolítica, permitiendo el manejo de un número mayor de muestras por vez.

**Bibliografía**

- Bernal, C., Vidal, L., Valdivieso, E., and Coello, N. (2003) Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:255- 261
- Brandelli, A. (2005) Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium sp.* *Annals of Microbiology* 55:47- 50
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2570- 2576
- Burns, D.S., Ooshima, H., and Converse, A.O. (1989) Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 20:79- 94
- Cavalitto, S.F., Hours, R.A., and Mignone, C.F. (1997) Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques* 11:331- 334
- Charney, J. & Tomarelli, R.M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry* 171:501- 505
- Chitte, R.R., Nalawade, V.K., and Dey, S. (1999) Keratinolytic activity from the broth of feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28:131- 136
- De Azaredo, L.A.I., De Lima, M.B., Coelho, R.R.R., and Freire, D.M.G. (2006) Thermophilic protease production by *Streptomyces sp.* 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. *Journal of Applied Microbiology* 100:641- 647
- De Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A., and Termignoni, C. (2002) Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Canadian Journal of Microbiology* 48:342- 348
- El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballa, A., El-Araby, M.H., and Abdel Fattah, A.F. (2005) Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry* 40:2325- 2332
- Estrada, P., Acebal, C., Castillon, M.P., Mata, I., and Romero, D. (1988) Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on wheat straw. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 10:49- 58
- Evans, K.L., Crowder, J., and Miller, E.S. (2000a) Subtilisins of *Bacillus spp.* hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian Journal of Microbiology* 46:1004- 1011
- Evans, K.L., Crowder, J., and Miller, E.S. (2000b) Subtilisins of *Bacillus spp.* hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian Journal of Microbiology* 46:1004- 1011

- Goldberger WM and Robbins LA (1984) Solid-Solid and Liquid-Liquid system. In: *Perry's chemical engineer's handbook.*, Perry R (ed) Sixth. 1-83
- Gradišar, H., Friedrich, J., Krizaj, I., and Jerala, R. (2005) Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3420- 3426
- Kim, J.M., Lim, W.J., and Suh, H.J. (2001) Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry* 37:287- 291
- Letourneau, Soussotte, Bressollier, Branland, and Verneuil (1998) Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Letters in Applied Microbiology* 26:77- 80
- Lin, X., Lee, C., Casale, E., and Shih, J.C.H. (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3271- 3275
- Lin, X., Inglis, G.D., Yanke, L.J., and Cheng, K.J. (1999) Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23:149- 153
- McLaren AD and Packer L (1970) Some aspect of enzyme reactions in heterogeneous system. In: *Advances in enzymology.*, Nord FF (ed) 1970. John Wiley & Sons, Bronx, pp 245-308
- Muhsin, T. & Aubaid, A. (2001) Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. *Mycopathologia* 150:121- 125
- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., and Pyun, Y.R. (2002) Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology* 178:538- 547
- Pissuwan, D. & Swaminathan, K. (2001) Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat Sci)* 35:171- 178
- Riffel, A., Ortolan, S., and Brandelli, A. (2003) De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78:855- 859
- Sangali, S. & Brandelli, A. (2000a) Feather keratin hydrolysis by *Vibrio* sp. strain kr2. *Journal of Applied Microbiology* 89:735- 743
- Sangali, S. & Brandelli, A. (2000b) Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 87:17- 24
- Santos, R.M., Firmino, A.A., de Sá, C.M., and Felix, C.R. (1996) Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Current Microbiology* 33:364- 370

*Determinaciones enzimáticas*

- Suntornsuk, W. & Suntornsuk, L. (2003) Feather degradation by *Bacillus sp.* FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology* 86:239- 243
- Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P., and Brandelli, A. (2004) Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology* 39:181- 186
- Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y., and Qian, S. (2009) Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces sp.* strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource Technology* 101:344- 350



## *Capítulo 3*

*Búsqueda de enzimas queratinolíticas producidas  
por hongos filamentosos aislados de suelos de la  
provincia de Buenos Aires*



**Resumen**

Con el objetivo de seleccionar uno o más microorganismos con capacidad de producir enzimas queratinolíticas, se llevó a cabo un screening de un grupo de hongos filamentosos aislados de suelos con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7.2 y 9.0, que constituyen el ecosistema de bosques nativos xéricos dominados por tala y coronillo. A este grupo de hongos filamentosos se le incorporó un hongo aislado de los suelos del Paseo del Bosque de la Ciudad de La Plata. El primer paso para la identificación de las cepas productoras de actividad queratinolítica consistió en estudiar la producción, por parte de los mismos, de un halo de hidrólisis cuando se hicieron crecer sobre un medio agarizado que contenía harina de pluma como sustrato queratínico. Si bien los 6 microorganismos estudiados tuvieron la capacidad de crecer sobre este medio, sólo 3 de ellos fueron capaces de hidrolizar este sustrato y generar un halo después de 15 días de cultivo.

Estos 3 microorganismos capaces de generar halo de hidrólisis fueron seleccionados para estudiar la producción enzimática en fermentaciones en sustrato sólido y en medios líquidos utilizando residuo pelo como fuente de carbono, nitrógeno y energía, obteniéndose la mayor producción de enzimas proteolíticas por parte de *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876, el cual fue seleccionado para este trabajo de tesis.

## **Introducción**

Hoy en día, gracias a los avances en el campo de la genética y la ingeniería de proteínas, las enzimas han adquirido un rol fundamental dentro de los procesos industriales. En la actualidad, los procesos biotecnológicos están empezando a reemplazar a ciertos procesos químicos, no sólo porque son una alternativa más amigable con el medio ambiente, sino también porque en algunos casos pueden resultar hasta económicamente más viables (Gupta & Ramnani, 2006). En términos generales un biocatalizador debe ser estable y activo en las condiciones del proceso en el que será usado para que éste resulte útil y tenga un impacto positivo sobre el mismo. Por lo que, el primer paso en el desarrollo de un producto enzimático suele ser un screening de un gran número de microorganismos adaptados a distintas condiciones ambientales a los efectos de poder obtener enzimas con características bioquímicas relevantes que las hagan atractivas y aptas para la aplicación en particular que uno desea. Una vez seleccionado el microorganismo, se continúa estudiando las condiciones de cultivo en las cuales se expresa en mayor cantidad el biocatalizador y se procede a su purificación y caracterización bioquímica. Generalmente esta última etapa suele complementarse con el desarrollo de técnicas de biología molecular para el clonado y sobreexpresión del gen codificante de este biocatalizador. Esto se realiza por varias razones, entre ellas, tener una producción del biocatalizador en cantidad adecuada del orden de los mg/l o g/l, simplificar el proceso de purificación y aumentar la actividad y estabilidad del mismo (ingeniería de proteínas). La adopción o no de este nuevo proceso enzimático dependerá entre otras cosas, del impacto en la calidad y costo del producto final, así como de las ventajas que presenta su implementación a nivel ambiental sustituyendo las etapas químicas generalmente contaminantes y consumidoras de energía.

El presente capítulo está relacionado con la búsqueda de microorganismos capaces de degradar un residuo de naturaleza queratínica (residuo pelo) mediante la producción de enzimas queratinolíticas. Los microorganismos capaces de degradar la queratina se encuentran en ambientes donde hay un constante abastecimiento de queratina, como por ejemplo áreas densamente pobladas por aves o mamíferos (Marcantini et al., 1980), suelos arables (Kornilowicz-Kowalska & Bohacz, 2002), así

### *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

como también en los lugares donde se encuentran desechos de este tipo de residuos como ser mataderos de aves y curtiembres, etc. Varios autores han reportado que sumada a la presencia de este sustrato, el contenido de humus del suelo, así como el pH del mismo entre neutro y levemente alcalino y el alto contenido de  $\text{CaCO}_3$  son factores favorables para el desarrollo de hongos queratinofílicos (Chmel et al., 1972; Garg et al., 1985; Kaul & Sumbali, 1997). Un ejemplo de este tipo de suelos lo constituye el ecosistema de los bosques nativos xericos dominados por las especies de árboles *Celtis tala* Gill ex Planch. (Fam. Ulmaceae) «tala» y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) «coronillo», asociado a los pastizales ocupados por *Distichlis spicata* (L.) Grenne, ubicados en la región oriental de la provincia de Buenos Aires (Arturi et al., 1996). Este conjunto de ecosistemas forman parte del “Parque Costero del Sur” (reserva de la Biosfera Costero Sur). Esta zona se caracteriza por los diferentes tipos de suelo, alcalino-calcareos (Rendolls), neutros (Argialbols) y alcalinos-sodicos (Natracualls). El grupo de investigación de la Dra. Marta Cabello del Instituto Spengazzini (UNLP) se ha dedicado desde ya hace varios años a la búsqueda de hongos filamentosos presentes en estos suelos y junto con la Dra. Lorena Eliades han realizado un relevamiento de los microorganismos queratinofílicos presentes en esta zona. Ese trabajo consistió en el aislamiento de 69 especies fúngicas de las cuales 32 resultaron ser positivas para la producción de actividad queratinolítica (Eliades, 2008). De ese trabajo se seleccionaron, para este trabajo de tesis, los mejores productores de actividad (*Acremonium murorum*, *Aspergillus sidowii*, *Cladosporium cladosporoides*, *Neurospora tetrasperma* y *Westerdykella dispersa*) y se incorporó además, una especie fúngica aislada de los suelos del Paseo del Bosque de la Ciudad de La Plata. (*Purpureocillium lilacinum* (ex *Paecilomyces lilacinus*) (Thom) Samson (Gortari et al., 2008) para seleccionar entre ellos el mejor productor de actividad queratinolítica, estudiar luego en profundidad su producción, purificación, caracterización y potenciales aplicaciones biotecnológicas.

### ***Hongos subdivisión Deuteromycota: Características Generales***

También denominada Fungi Imperfecti (hongos imperfectos), esta subdivisión clasifica a numerosos hongos cuya reproducción sexual no ha sido aún observada (Rivera Coto, 1991). A excepción de las levaduras esporógenas, la mayoría de la

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

especies se reproducen por conidios, observándose que los estados conidiales son muy similares a los presentes en algunos Ascomycotinos bien conocidos. Lo cual permite suponer que los hongos imperfectos representan estados conidiales de Ascomycota (o más raramente Basidiomycota) cuyos estados ascígeros (desarrollo del asco) se forman tan raramente en la naturaleza que no han sido hallados, o bien han desaparecido del ciclo biológico en la evolución de estos organismos.

Con excepción del talo de las levaduras esporógenas, el talo de los Fungi Imperfecti suele estar formado por un micelio bien desarrollado, formado por hifas septadas y ramificadas. Los conidios se encuentran generalmente en el extremo de los conidióforos, y éstos pueden estar distribuidos a lo largo de hifas somáticas o bien agruparse para constituir varios tipos de cuerpos fructíferos asexuados o conidiosmas. Los caracteres básicos que se utilizan para la clasificación de estos hongos son su forma de reproducción, la ontogenia en la producción de esporos, forma, color, etc (Larone, 1995; Collier et al., 1998).

Los hongos estudiados en este capítulo son hongos imperfectos y se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de crecer a distintos valores de pH en hongos alcalinos tolerantes (crecen tanto a pH 9.0-10.0 como a pH 6.0) y hongos alcalofílicos (crecen solamente a pH 9.0-10.0) (Elíades et al., 2006). Algunos de estos hongos como *P. lilacinum* y *A. murorum* se encontraron en gran abundancia en suelos perturbados y no perturbados por la acción humana, en tanto que otros como *C. cladosporoides* se encuentra en forma escasa en suelos perturbados (Cabello & Arambarri, 2002; Elíades et al., 2006).

De manera muy sucinta se detallan a continuación las características de los géneros estudiados en esta tesis.

### *Acremonium murorum*

Es un hongo cosmopolita, aislado de suelos y restos vegetales. Algunas especies suelen ser causantes de infecciones como endocarditis, micetoma eumicótico, o queratitis (Fincher et al., 1991). *Acremonium* posee una tasa de crecimiento relativamente rápido, madurando luego de una semana. Se desarrolla en colonias de 1-3

### *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

cm luego de haber sido incubado a 25 °C durante 7 días en agar papa glucosado (APG). La textura de la colonia es compacta y aterciopelada. Luego de un determinado período de tiempo, puede presentar un aspecto algodonoso debido al crecimiento excesivo de las hifas. Las colonias suelen presentar un color blanco, gris pálido o rosa en su superficie, con un reverso sin color o también rosa debido a la producción de pigmentos (Collier et al., 1998). Al microscopio se observan hifas hialinas tabicadas de espesor muy fino. Suele observarse que las hifas a menudo forman cuerdas. En la punta de las hifas se forman fiálides no ramificados y erectos, separados de éstas por un tabique. En los ápices de las fiálides se encuentran los conidios, hialinos, de 2-3 x 4-8 µm. Generalmente se encuentran en grupos (clusters), unidos por un material gelatinoso (Larone, 1995).

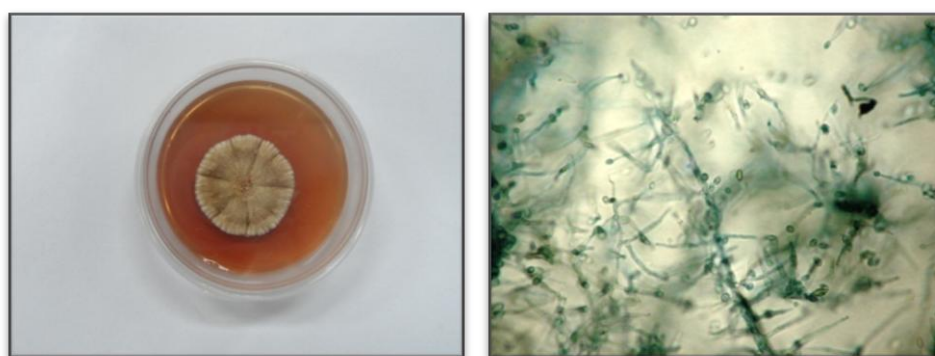


Figura 1. *Acromonium murorum* LPSC # 57: A la derecha se observa la colonia en APG, coloración rosácea debido a la formación de pigmentos. A la izquierda se observan los conidios formando clusters (40x)

### *Aspergillus sidowii*

Es un hongo saprofito que se encuentra en los suelos y que pueden contaminar alimentos. Es el hongo predominante en el trigo Qu (fuente más utilizada de microorganismos y enzimas para el vino de arroz) (Shang et al., 2012). Desde los años '90, se lo encuentra en las aguas del mar Caribe como agente causal de la aspergilosis en los abanicos de mar (*sea fans*) (Rypien et al., 2008). En APG este hongo produce colonias de un color verde azulado con tonos marrones rojizos. La cabeza aspergilar presenta una forma radiada, con vesículas esféricas o casi esféricas con doble serie de

### *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

células conidiogenas (cabeza aspergilar biseriada). Los conidióforos son hialinos. Los conidios son azules, esféricos y suelen medir 2.5-4.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Harris, 2001).

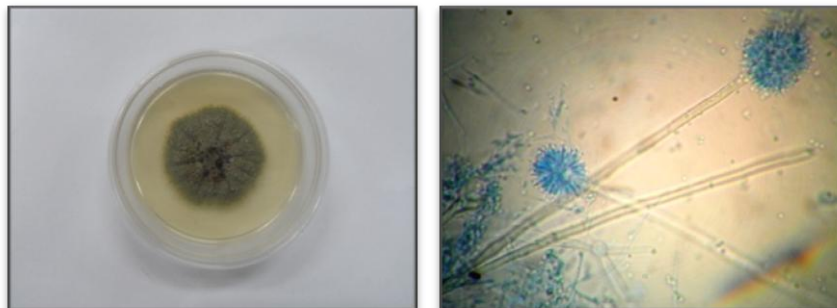


Figura 2. *Aspergillus sidowii* LPSC # 931: A la derecha se observa la colonia en APG, colonias de un color verde con tonos marrones rojizos. A la izquierda se observan las cabezas aspergílares (40x)

### *Cladosporium cladosporioides*

Hongo demateáceo ampliamente distribuido en el aire y material orgánico en pudrición. En APG, a 25 °C, posee una tasa de crecimiento moderada, desarrollando colonias de color verde oliva, marrón o negras en el anverso y en el reverso de la colonia el color es negro, de textura aterciopelada. La mayor parte de las especies de *Cladosporium* sp. no crecen a temperaturas superiores a 35 °C. Al microscopio se observan hifas pigmentadas y tabicadas con conidióforos erectos, pigmentados y no geniculados. Los conidios son de forma elíptica o cilíndrica, de color pálido al marrón oscuro. Se presentan en cadenas que se desarticulan fácilmente. Esta especie en particular además, suele producir conidios unicelulares (Collier et al., 1998).

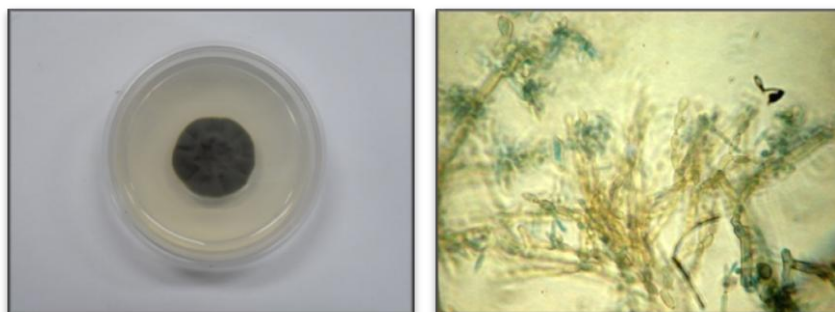


Figura 3. *Cladosporium cladosporioides* LPSC # 953: A la derecha se observa la colonia en APG, colonias de un color verde oliva. A la izquierda se observan hifas pigmentadas y tabicadas. Los conidios son de una forma elíptica o cilíndrica, de un color pálido (40x)



## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

### *Neurospora tetrasperma*

Conocido como el hongo naranja del pan, es un microorganismo “modelo” para investigaciones científicas por su rápido crecimiento y su capacidad de supervivencia en medios mínimos. Se lo encuentra en áreas tropicales y subtropicales y se aisló por primera vez en la Argentina de los suelos del Parque Costero Sur en el año 2006 (Elíades et al., 2006). En APG a 25 °C posee un crecimiento rápido, con colonias naranjas o amarronadas, con abundante producción de ascomas ostiolados de color oscuro (180-570  $\mu\text{m}$ ) con 4 ascosporos. Los ascosporos son de forma elipsoidal o alargados, hialinos de color marrón amarillento, presentan en su pared nervaduras longitudinales y en cada extremo un poro germinativo (Elíades et al., 2006).

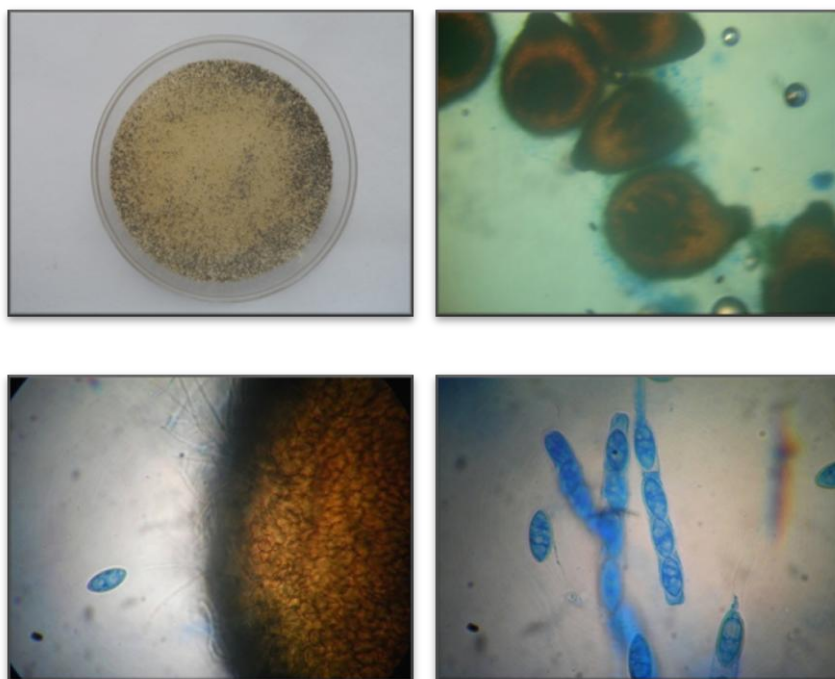


Figura 4. *Neurospora tetrasperma* LPSC # 837: A la derecha arriba se observa la colonia en APG, colonias naranja-amarronada con abundante producción de ascomas oscuras. A la izquierda se observan los ascomas, en el interior se observan los ascosporos (10x). Abajo derecha se observa el borde de un ascoma con un ascosporo. A la izquierda se observan hileras de ascosporos de forma elipsoidal (40x)

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

### *Purpureocillium lilacinum* (ex *Paecilomyces lilacinus*)

Hongo filamentoso, cosmopolita que ha sido aislado de una amplia variedad de hábitats, incluyendo suelos, bosques, desiertos y sedimentos de estuarios, así como en la rizósfera de diferentes cereales y en productos alimenticios. Se lo ha encontrado también en los huevos de nematodos en los nudos de las raíces de las plantas. Es una especie capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (8-38 °C) y presenta una amplia tolerancia a pHs extremos, pudiendo crecer en una gran variedad de sustratos (Domsch & Gams, 1980). En APG, *P. lilacinum* forma un denso micelio que primero es de color blanco y luego de 10 días toma una coloración vinaceo o violáceo que da origen a los conidióforos, éstos soportan fiálides divergentes con largas cadenas de conidios elípticos (Samson, 1974). Esta especie se aisló de los suelos del paseo del Bosque de La Plata en el año 2007 (Gortari et al., 2008).

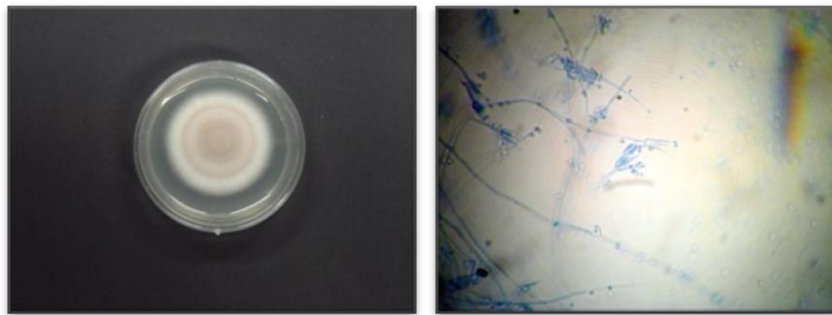


Figura 5. *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: A la derecha se observa la colonia en APG de color violáceo claro luego de 5 días de cultivo. A la izquierda se observan las fiálides largas y divergentes con conidios elípticos (40x)

### *Westerdykella dispersa*

Hongo saprofítico aislado por primera vez en la Argentina en el año 2006, presenta un micelio homotálico con profusas ramificaciones. En APG forma colonias claras con abundante producción de ascomas con ascos globosos de 10-14.5  $\mu\text{m}$  con ascosporos de 2.0-3.0 x 2.5-5  $\mu\text{m}$ , hialinos en los primeros estadios y luego marrones claros (Elíades et al., 2006).

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

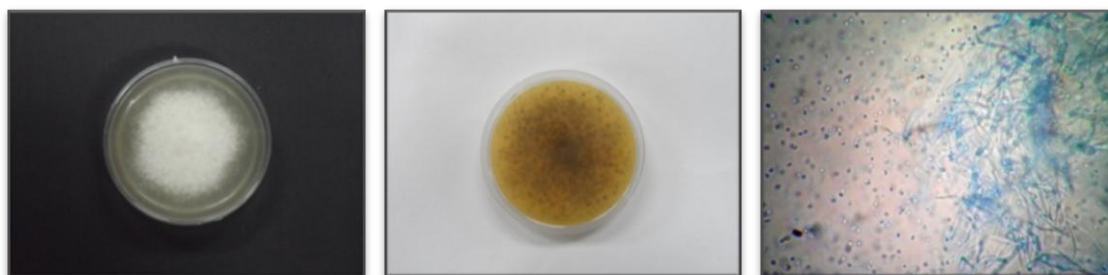


Figura 6. *Westerdykella dispersa* LPSC # 834: A la derecha se observa el anverso de la colonia en APG color blanco, en el medio se observa el reverso de la colonia con abundante producción de ascomas globosos. A la izquierda se observan abundantes ascosporos (40x)

### ***Cultivo de hongos imperfectos***

Los hongos pueden cultivarse *in vitro* sobre la superficie de medios agarizados, o bien sobre medios particulados sin agua libre. Éste último sistema es conocido como fermentación en sustrato sólido (FSS). Alternativamente también se los puede cultivar en medios líquidos (cultivos sumergidos) en los cuales el micelio se encuentra totalmente disperso en el medio acuoso. Desde el punto de vista fisiológico, la FSS es el sistema de cultivo que probablemente mejor refleje las condiciones ambientales que estos hongos encuentran en el suelo. Los hongos filamentosos se adaptan fácilmente a este tipo de sistema, ya que su crecimiento en forma de hifas los favorece desde el punto de vista de la colonización y el aprovechamiento de nutrientes disponibles. La FSS se puede llevar a cabo empleando sustratos naturales con alta capacidad de adsorber agua, como granos (arroz, cebada, etc), residuos agroindustriales (afrechos, pomazas de frutas, etc) o bien utilizando soportes porosos impregnados en medio nutritivo (Pandey, 2003). En el presente trabajo se utilizó el crecimiento en medios agarizados como un pre-screening de estos hongos con el fin de seleccionar aquellos que presentaba actividad proteolítica extracelular. Luego, los hongos seleccionados fueron cultivados utilizando ambos sistemas de cultivo: el sistema de fermentación en sustrato sólido y fermentación en medios líquidos. En el pre-screening se utilizó harina de pluma como sustrato queratínico y en los cultivos se utilizó residuo pelo.

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

### **Materiales y métodos**

#### ***Microorganismos, medios y condiciones de cultivo***

Para la selección de microorganismos productores de enzimas con actividad queratinolítica se utilizaron seis especies fúngicas no patógenas aisladas de suelos de la provincia de Buenos Aires, todas ellas pertenecientes a la colección del Instituto Spegazzini de la Universidad Nacional de La Plata (*Acremonium murorum* (Corda) Gams var. *murorum* LPSC # 57, *Aspergillus sidowii* LPSC # 931, *Cladosporium cladosporoides* LPSC # 953, *Neurospora tetrasperma* LPSC # 837, *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Samson LPSC # 876 y *Westerdykella dispersa* LPSC # 834). Las cepas fueron proporcionadas por la Dra Lorena Elíades, Dra. Lorena Rojas (*A. murorum*) y la Med. Vet. Cecilia Gortari (*P. lilacinum*). A partir de los cultivos en tubos con agar inclinado, se realizó un repique de cada uno de ellos a placas con agar papa glucosado (APG) a fin de tener un cultivo stock, que fue conservado a 4 °C.

#### ***Conservación de las cepas***

De los cultivos stock de cada una de las cepas, se sembraron erlenmeyer de 100 ml con medio APG para producir conidios, los cuales se resuspendieron en una solución crioprotectora de leche descremada (10 % p/v) e inositol trifosfato (5 % p/v) y se liofilizaron. Al final del proceso, las ampollas con el liofilizado fueron saturadas con N<sub>2</sub> a los efectos de excluir la posible presencia de O<sub>2</sub> y vapor de agua, se sellaron y se conservaron a 4 °C. Cuando fue necesario, las cepas liofilizadas se recuperaron mediante rehidratación con agua estéril seguida por plaqueo en medio APG. Estos cultivos se conservaron refrigerados por un período no mayor de 2 meses; transcurrido este tiempo se desecharon y se prepararon nuevamente. Para la preparación de los inóculos se partió siempre de una placa de APG.

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

### ***Ensayo cualitativo de la producción de actividad queratinolítica utilizando Agar Harina de Pluma***

La capacidad de las cepas fúngicas de producir enzimas queratinolíticas fue evaluada sembrando puntualmente cada una de ellas en el centro de placas de agar harina de pluma (FMA-*feather meal agar*), las cuales se incubaron a 28 °C y se observaron diariamente. La capacidad de producir enzimas queratinolíticas se determinó de acuerdo a la presencia o ausencia de halo de hidrólisis (Sangali & Brandelli, 2000). La composición de FMA es (g/l): harina de pluma, 15; NaCl, 0.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 y agar, 15 (pH 7.2) (Sangali & Brandelli, 2000). Aquellas cepas que presentaron halo fueron seleccionadas para el estudio de la producción utilizando residuo pelo como sustrato queratínico en los dos sistemas de cultivos antes mencionados: fermentación en sustrato sólido y en medio líquido.

### ***Producción del inóculo (suspensión de conidios) para los cultivos***

Los conidios se obtuvieron a partir de cultivos en APG incubados durante 10 días en oscuridad a 28 °C de cada una de las cepas resuspendiéndolos con una solución estéril (10 ml) de Tween 80 (0.05 % p/v). La concentración de esporos se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

### ***Cultivos en sustrato sólido y medio líquido***

Se utilizó un medio mineral base formulado de la siguiente manera (g/l): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.496; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.486; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.016; ZnCl<sub>2</sub>, 0.013; MgCl<sub>2</sub>, 0.010 y de CaCl<sub>2</sub>, 0.11 mg (pH 7.0) (Galarza et al., 2007). Como sustrato se utilizó residuo pelo proveniente de una curtiembre local que utiliza el método de depilado conservador de pelo. Éste se lavó con agua corriente reiteradas veces para retirar restos de piel y se secó a 60 °C durante 2 días. Luego se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

- *Cultivos en medio sólido*: La FSS se llevó a cabo en placas de Petri conteniendo 3.0 g de residuo pelo, esterilizadas por autoclave (15 min a 121 °C), e inoculadas con 10 ml

### *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

de la solución mineral base conteniendo  $2 \times 10^6$  conidios por ml. Las cajas fueron incubadas durante 28 días en atmósfera saturada a 28 °C. Al tercer día de cultivo se tomo la primera muestra y luego se tomaron muestras diariamente. Se tomaron 2 cajas de cada uno de los cultivos y se procedió al procesado de los mismos. El contenido completo de cada placa se transfirió un vaso de precipitado al cual se le adicionó 30 ml de una solución 0.5 M NaCl y se agitó durante 15 minutos mediante una barra magnética. El extracto crudo obtenido en este paso se centrifugó ( $5000 \times g$ , 20 min, 4 °C) para retirar los restos de residuo pelo y biomasa, y luego se filtró a través de una membrana de celulosa de 0.45 mm. El extracto enzimático se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis (Galarza et al., 2005).

- *Cultivos líquidos*: Las fermentaciones sumergidas (FS) se llevaron a cabo en erlenmeyers de 500-ml conteniendo 200 ml de medio mineral base con 2 g de residuo pelo esterilizados por autoclave (15 min a 121 °C) e inoculados con una suspensión de conidios para obtener una concentración en el erlenmeyer de  $2 \times 10^6$  conidios por ml. Los cultivos se incubaron a 28 °C por un término de 17 días a 200 rpm en agitación orbital (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). De igual manera que en los cultivos sólidos, luego del tercer día se tomaron muestras diarias de 5 ml de cada cultivo, los cuales se centrifugaron ( $5000 \times g$ , 20 min, 4 °C) para retirar los restos de residuo pelo y biomasa. El sobrenadante (extracto enzimático) se conservó a -20 °C hasta su análisis.

### ***Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas***

Las muestras de las FSS y FS fueron analizadas en términos de actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato, siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 2. El contenido de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

### ***Análisis estadístico***

## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

Todos los cultivos se realizaron por duplicado, en tanto que las determinaciones analíticas (actividad proteolítica y determinación de proteínas) se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

## Resultados y discusión

### *Ensayo cualitativo de la producción de actividad queratinolítica*

*A. murorum*, *A. sidowii*, *C. cladosporoides*, *N. tetrasperma*, *P. lilacinum* y *W. dispersa* fueron las cepas seleccionadas para el estudio de la producción de queratinasas. El primer paso de esta selección consistió en el uso de un ensayo cualitativo con el fin de seleccionar las cepas positivas sin importar cuánta actividad produjera cada una de ellas. Luego de 15 días de cultivo, se observó que, si bien las 6 cepas fueron capaces de crecer en FMA sólo 3 de ellas produjeron un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, indicativo de que poseían actividad queratinolítica extracelular (Figura 7).

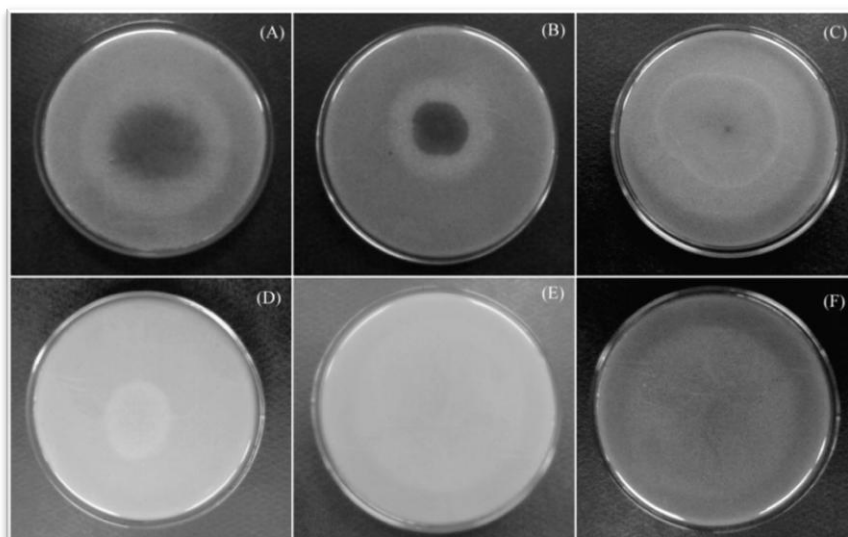


Figura 7. Ensayo cualitativo en placas de agar harina de plumas. A) *A. murorum*, B) *C. cladosporoides*, C) *P. lilacinum*, D) *A. sidowii*, E) *N. tetrasperma* y F) *Westerdikella dispersa*. A, B y C: cepas positivas con halo de hidrólisis alrededor de las colonias.

Wawrzkieicz et al. (1991) atribuyen esta observación (halo de hidrólisis) a una secreción activa de enzimas queratinasas al medio (enzimas extracelulares). Varios autores han reportado el uso de esta técnica con el fin de seleccionar microorganismos con habilidad de hidrolizar queratina, como Sangali & Brandelli (2000). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta prueba cualitativa, *A. murorum*, *C. cladosporoides* y *P.*



## *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

*lilacinum* fueron los hongos seleccionados para continuar con el estudio de la producción enzimática.

### ***Fermentación en sustrato sólido***

Un aspecto crítico de la FSS es el control de la actividad acuosa ( $a_w$ ) del medio, ya que en este tipo de cultivos la mayor parte del agua se encuentra adsorbida en el material sólido o sustrato. La disminución de  $a_w$  por debajo de un valor óptimo afecta marcadamente el crecimiento de los hongos (y microorganismos en general) lo que se manifiesta en una extensión de la fase de latencia, disminución de la velocidad específica de crecimiento y reducción de la producción de biomasa. Si bien los hongos pueden tolerar valores de  $a_w$  del orden de 0.95, en esta tesis se asumió como valor mínimo aceptable para el crecimiento un valor de 0.98, para evitar efectos adversos sobre el crecimiento fúngico y la producción de enzimas.

Como es sabido, todo cuerpo poroso adsorbe o pierde humedad si no hay una igualdad entre la actividad acuosa del vapor del aire circundante y del cuerpo húmedo. Mientras que los valores de la presión de vapor sean diferentes, habrá una transferencia de humedad del cuerpo al medio circundante o viceversa. La magnitud de esta diferencia depende esencialmente de la humedad relativa (HR) del aire. Durante este proceso la temperatura del cuerpo poroso tiende a alcanzar la temperatura seca del ambiente, por lo tanto, existe una relación directa entre la temperatura, la humedad de un ambiente dado y la humedad de equilibrio del material. Se llega de esta forma a la noción de equilibrio higroscópico, que corresponde al equilibrio entre las presiones parciales de vapor del aire del ambiente y del sustrato húmedo. Por definición, la  $a_w$  del sólido es el valor de la HR con la cual está en equilibrio y corresponde a la disponibilidad del agua para intervenir en reacciones de cualquier tipo (Rojas, 2009).

Para caracterizar el residuo pelo en relación a sus propiedades de hidratación (relación entre contenido de agua y  $a_w$ ), la Dra. Elíades (2008) determinó las isotermas de desorción de agua en un rango de 1.0 a 0.9. Comúnmente se realizan isotermas de adsorción y desorción para caracterizar las propiedades de hidratación de un sólido y en general son diferentes debido al fenómeno de histéresis. En nuestro caso, se consideró

*Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

únicamente la isoterma de desorción ya que en la práctica el medio sólido se prepara con una humedad inicial equivalente a una  $a_w$  de 1.0 y se asume que en el transcurso del cultivo la humedad puede disminuir a un valor crítico para el crecimiento microbiano. A partir de los resultados obtenidos por la Dra. Elíades (2008) se determinó que para lograr un valor de  $a_w$  de 0.98 como mínimo aceptable para los cultivos fúngicos, la humedad del medio debe ser mayor o igual a 2.37 g de agua / g de residuo pelo.

La FS se llevó a cabo en placas de Petri con 3 g de residuo pelo, inicialmente cada placa contenía 3.33 g de agua/g de residuo pelo y se incubaron por un período de 28 días en atmósfera saturada, tomando dos placas diarias a partir del tercer día de cultivo para las determinaciones analíticas de actividad y proteínas. Las 3 cepas fúngicas estudiadas crecieron sobre este sustrato queratínico, sin embargo la mayor producción de actividad proteolítica (medida indirecta de la actividad queratinolítica) se observó para *P. lilacinum* (Figura 8 A).

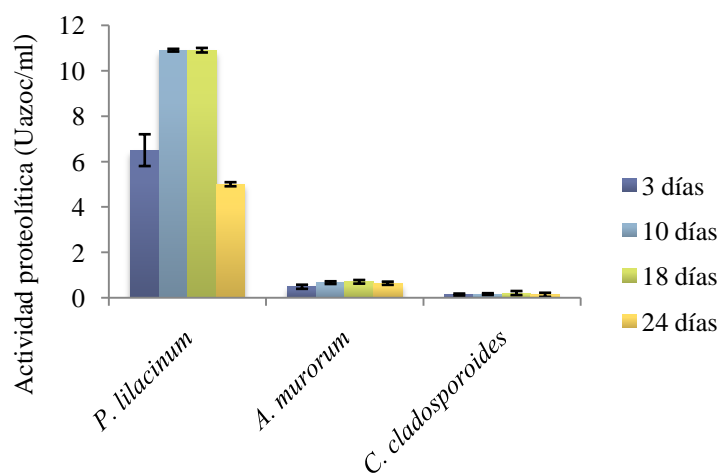


Figura 8 A. Producción de actividad proteolítica por varias cepas de hongos. La actividad de proteasa se determinó mediante el ensayo de azocaseína después de 3, 10, 18 y 24 días de incubación para el cultivo de estado sólido

Se observó que la actividad proteolítica de este hongo ya era bastante superior a los 3 días de cultivo en comparación con la de los otros dos hongos estudiados, alcanzando un máximo a los 10 días, el cual se mantuvo por alrededor de 8 días, para descender a 5.0 U<sub>azoc</sub>/ml luego de 24 días de cultivo. El hecho de que se haya

### *Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

observado un valor de 10.9 U<sub>azoc</sub>/ml a los 10 y 18 días de cultivo puede tener dos explicaciones posibles, una puede ser la prolongada estabilidad que presenta el extracto enzimático producido por el hongo en esas condiciones de cultivo o, que durante ese período de tiempo la velocidad neta de acumulación de la misma se haya mantenido constante, es decir, velocidad de producción y de auto proteólisis se mantuvieron constantes y luego (24 días) haber sido mayor la velocidad auto proteólisis dando como resultado una menor actividad. El estudio de la producción de queratinasas en FSS es un tópico que no ha sido muy desarrollado, existen sólo algunos reportes de producción utilizando sustratos tan variados que van desde las plumas y harina de cuernos hasta el uso de bagazo de caña o paja de arroz (De Azaredo et al., 2006; Rai et al., 2009; Kumar et al., 2010; El-Gendy, 2010), sin embargo el uso de residuo pelo como sustrato en FSS es limitado a un screening para la selección de especies potencialmente queratinolíticas sin hacer un estudio más profundo de la producción o caracterización de las enzimas (Elíades et al., 2010) y a su potencial utilización como sustrato para la producción de enzimas por el hongo *Trichophyton ajelloi* (Galarza et al., 2004; Galarza et al., 2005).

### ***Fermentación sumergida***

Es un hecho que el metabolismo que presenta un microorganismo cuando es cultivado en FSS y en FS es totalmente distinto, por ejemplo *Aspergillus niger* cuando es cultivado en presencia de salvado de trigo y leche de soja produce la enzima fitasa sólo en FSS (884 U/g) y no hay actividad detectable con los mismos sustratos en FS (Krishna & Nokes, 2001) o viceversa, en el caso de la enzima xilanasas es producida por *Bacillus* sp. en mayor título cuando se lo cultiva en FS (6.18 U/g en FSS contra 16.13U/ml) (Gupta & Kar, 2009). Por esta razón se decidió someter a las 3 cepas fúngicas: *A. murorum*, *C. cladosporoides* y *P. lilacinum* a fermentaciones sumergidas y ver el comportamiento enzimático. Al igual que sucedió con las fermentaciones en sustrato sólido, todas las cepas fueron capaces de crecer y producir actividad proteolítica, sin embargo *P. lilacinum* resultó ser el que mayor título obtuvo (Figura 8 B).

*Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

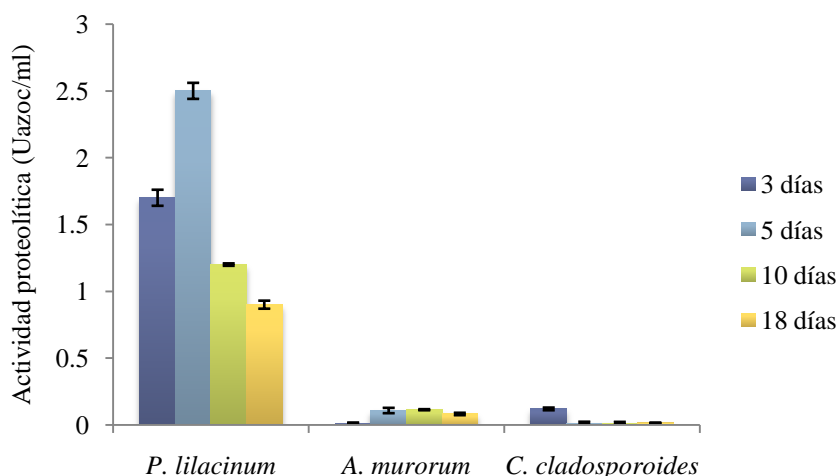


Figura 8 B. Producción de actividad proteolítica por varias cepas de hongos. La actividad de proteasa se determinó mediante el ensayo de azocaseína después de 3, 5, 10 y 18 días de incubación.

Sin embargo al comparar con la FSS, la actividad obtenida en este sistema de cultivo es menor. Una ventaja ampliamente aceptada de la FSS es que la cantidad de enzima producida por hongos filamentosos suele ser superior que la producida en FS, sin embargo dentro de las ventajas de la FS se encuentran una purificación más sencilla de los productos, mayor eficiencia en la transferencia de calor y materia, permite el modelado del proceso y el escalado suele resultar más fácil (Fang et al., 2013).

De los resultados anteriores se seleccionó el hongo *P. lilacinum* para continuar con este trabajo de tesis, el cual incluye el estudio y optimización de la producción de la/s queratinasa/s, su purificación y caracterización, su inmovilización y el estudio de las posibles aplicaciones de la misma y del hidrolizado de proteínas obtenido por acción de la misma sobre el residuo pelo. Debido a las ventajas expuestas arriba, en las etapas donde fue necesaria la producción de la enzima, se optó por utilizar el sistema de fermentación sumergida.

## Conclusiones

Se presentó en este capítulo la selección de la mejor cepa fúngica productora de actividad proteolítica (utilizada como medida indirecta de la actividad queratinolítica). Primeramente se realizó un ensayo cualitativo utilizando un medio agarizado con harina de pluma como sustrato. En este medio, las cepas capaces de producir actividad queratinolítica extracelular presentaron alrededor de la colonia un halo de hidrólisis. Una vez seleccionadas estas cepas se procedió al estudio de la producción enzimática utilizando residuo pelo como sustrato en los dos sistemas de cultivos conocidos: fermentación en sustrato sólido y fermentación sumergida. Si bien las 3 cepas: *A. murorum*, *C. cladosporoides* y *P. lilacinum* crecieron en presencia de este sustrato queratínico como única fuente de carbono y energía, *P. lilacinum* resultó ser la cepa que mayor actividad produjo, siendo de esta manera seleccionado para continuar con el trabajo de tesis.

Comparando los resultados obtenidos en el ensayo sobre FMA y en los cultivos FSS y FS, se ve claramente que no se puede establecer una relación tan directa entre el halo de hidrólisis y la actividad obtenida después. Esto pudo deberse a la utilización de diferentes fuentes de queratina. La harina de plumas, debido a su método de obtención, se compone principalmente por una queratina altamente desnaturalizada ( $\beta$ -queratina) y de alguna manera podría ser hidrolizada con mayor facilidad que el residuo pelo, el cual presenta en su estructura mayor porcentaje de puentes disulfuro haciéndolo más refractario a la degradación ( $\alpha$ -queratina) (Brandelli, 2005). Por lo que, se puede proponer el uso de este ensayo como una primera prueba preliminar para evaluar la capacidad queratinolítica de un microorganismo, debiéndose luego confirmar por una evaluación cuantitativa de la producción enzimática de SSF o SF.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en JMB (Cavello et al., 2013).

**Bibliografía**

- Arturi, M., Barrera, M.D., and Brown, A.D. (1996) Caída y masa de hojarasca en bosques de *Celtis tala* Gill ex Planch y *Scutia buxifolia* Reiss del este de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista Facultad de Agronomía Universidad Nacional de La Plata 101:151- 158
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248- 254
- Brandelli, A. (2005) Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium sp.* Annals of Microbiology 55:47- 50
- Cabello, M. & Arambarri, A. (2002) Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). Microbiological Research 157:115- 125
- Cavello, I., Chesini, M., Hours, R., and Cavalitto, S. (2013) Study of the production of alkaline keratinases in submerged cultures as an alternative for solid waste treatment generated in leather technology. Journal of Microbiology and Biotechnology 23:982- 992
- Chmel, L., Hasilíková, B., Hrasco, J., and Vlacíková, A. (1972) The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in soil. Sabouraudia 10:26- 34
- Collier L, Balows A, and Sussman M (1998) Topley & Wilson`s Microbiology and Microbial infections. New York
- De Azaredo, L.A.I., De Lima, M.B., Coelho, R.R.R., and Freire, D.M.G. (2006) Thermophilic protease production by *Streptomyces sp.* 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. Journal of Applied Microbiology 100:641- 647
- Domsch KH and Gams W (1980) Compendium of soil fungi. Academic Press., London, United Kingdom., pp 859-860
- El-Gendy, M.M.A. (2010) Keratinase production by endophytic *Penicillium spp.* Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. Applied Biochemistry and Biotechnology 162:780- 794
- Elíades, L. (2008) Estudio de la microbiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques *Celtis tala* Grill (ex Planch) y *Scutia buxifolia* Reiss en el Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires. 123- 125
- Elíades, L., Cabello, M., and Voget, C.E. (2006) Contribution to the study of alkalophilic and alkali-tolerant ascomycota from Argentina. Darwiniana 44:64- 73
- Elíades, L., Cabello, M., Voget, C.E., Galarza, B., and Saparrat, M. (2010) Screening for alkaline keratinolytic activity in fungi isolated from soils of the biosphere reserve " Parque Costero del Sur" ( Argentina ). World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:2105- 2111

*Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

- Fang, Y., Ahmed, S., Liu, S., Wang, S., Lu, M., and Jiao, Y. (2013) Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation. *Carbohydrate Polymers* 98:1377- 1382
- Fincher, R.M., Fisher, J.F., Lovell, R.D., Newman, C.L., Espinel-Ingroff, A., and Shadomy, H.J. (1991) Infection due to the fungus *Acremonium (cephalosporium)*. *Medicine* 70:398- 409
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, M.L., Reinoso, H.M., and Lopez, L.M.I. (2004) Fungal biotransformation of bovine hair part I: Isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 88:93- 98
- Galarza, B.C., Garro, M.L., Cavello, I.A., Cazau, M.C., Hours, R.A., and Cantera, C.S. (2007) Fungal biotransformation of bovine hair: Assessment of structural changes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 91:229- 232
- Galarza, B.C., Goya, L., Garro, M.L., Mercerat, J., Hours, R.A., and Cantera, C.S. (2005) Fungal biotransformation of bovine hair part II: biomass and proteases produced as a function of incubation time. Assessment of hair waste digestion. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 90:169- 172
- Garg, A.P., Gandotra, S., Mukerji, K.G., and Pugh, G.J. (1985) Ecology of keratinophilic fungi. *Proceeding of Indian Academy of Science (Plant Sci )* 94:149- 163
- Gortari, C., Cazau, M.C., and Hours, R. (2008) Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología* 24:24- 28
- Gupta, R. & Ramnani, P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview . *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21- 33
- Gupta, U. & Kar, R. (2009) Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52:1363- 1371
- Harris, J.L. (2001) Atlas of Clinical Fungi, 2nd Edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures. *Mycopathologia* 152:159- 160
- Kaul, S. & Sumbali, G. (1997) Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia* 139:137- 140
- Kornilowicz-Kowalska, T. & Bohacz, J. (2002) Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycologica* 37:101- 116
- Krishna, C. & Nokes, S.E. (2001) Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotech* 26:161- 170
- Kumar, R., Balaji, S., Uma, T.S., Mandal, A.B., and Sehgal, P.K. (2010) Optimization of influential parameters for extracellular keratinase production by *Bacillus subtilis* (MTCC9102) in solid state fermentation using horn meal-a biowaste management. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:30- 39

*Búsqueda de enzimas queratinolíticas*

- Larone DH (1995) *Medically Important Fungi - A guide to Identification*. AMS Press, Washington D.C.
- Marcantini, R., Marsella, F., Caprilli, F., and Dovgiall, G. (1980) Isolation of dermatophytes and correlated species from the soil of public gardens and park of Rome. *Sabouraudia* 18:123- 128
- Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:81- 84
- Rai, S.K., Konwarh, R., and Mukherjee, A.K. (2009) Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline  $\beta$ -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochemical Engineering Journal* 45:218- 225
- Rivera Coto G (1991) Los hongos como agentes causales de las enfermedades en las plantas. In: *Conceptos Introductorios a la Fitopatología*, Primera Edición. 52-56
- Rojas, L. (2009) Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii*. 51-55
- Rypien, K.L., Andras, J.P., and Harvell, C.D. (2008) Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Molecular Ecology* 17:4068-4078
- Samson, R.A. (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6:119- 120
- Sangali, S. & Brandelli, A. (2000) Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 87:17- 24
- Shang, Y.L., Chen, L.L., Zhang, Z.H., and Lu, J. (2012) A comparative study on the fungal communities of wheat *Qu* for Qingshuang-type Chinese rice wine. *Journal of the Institute of Brewing* 118:243- 248
- Wawrzkievicz, K., Wolski, T., and Lobarzewski, J. (1991) Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia* 114:1- 8



# Capítulo 4

*Optimización de las condiciones de cultivo para la  
producción de enzimas queratinolíticas por  
Purpureocillium lilacinum LPSC#876.  
Caracterización del extracto enzimático*



## Resumen

El presente capítulo describe el estudio de la producción de queratinasas por *P. lilacinum*, la optimización de los componentes del medio de cultivo para maximizar esta producción y la caracterización bioquímica del extracto enzimático.

Con el objetivo de definir cuáles factores afectan la producción de las enzimas queratinolíticas se realizó un primer estudio utilizando la metodología conocida como *one-variable-at-a-time*. Se estudió el efecto de la incorporación de fuentes de nitrógeno exógenas, la existencia o no de represión catabólica por glucosa, el efecto de la variación de la concentración de iones propios del medio mineral base, así como el agregado de otros iones metálicos como  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$  y del agregado de diferentes agentes reductores al medio de cultivo. Dentro de los parámetros físicos del cultivo, se estudió el efecto del pH inicial y de la temperatura. Se observó que la adición de glucosa (5 g/l) y de extracto de levadura (2.23 g/l) al medio basal con residuo pelo como sustrato llevó a un aumento en la producción de queratinasas. La temperatura óptima y el pH inicial para la producción fueron 28 °C y 6.0, respectivamente. Se observó un efecto beneficioso cuando la concentración original de los cuatro iones metálicos presentes en el medio mineral base, se redujo en una relación 1:10 con respecto a la original. El rendimiento máximo de la enzima fue de 15.96 U azoc/ml, valor 6.5 veces superior al medio de cultivo base del que se partió.

Una vez definidas las nuevas condiciones de cultivo (definidas por la metodología *one-variable-at-a-time*), se continuó con la optimización del medio mediante el uso de dos métodos estadísticos: un factorial fraccionario de Plackett-Burman seguido de un diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable. Con esta última metodología se optimizaron aquellos factores que resultaron ser estadísticamente significativos en el diseño de PB: pH inicial, concentración de glucosa y  $CaCl_2$ . Las condiciones óptimas de cultivo resultaron ser: 7.10 g/l de glucosa; 0.0065 mg/l de  $CaCl_2$  y pH inicial de 5.60. Para esta condición de cultivo, el rendimiento máximo predicho por el modelo fue de 26.7 U azoc/ml. La validación del modelo demostró que, tanto el polinomio como las correspondientes superficies de respuesta

### *Optimización de los cultivos líquidos*

obtenidas describen adecuadamente la influencia de la concentración de glucosa, de calcio y el pH inicial en la producción de queratinasas.

Finalmente, el extracto enzimático fue caracterizado bioquímicamente. Las condiciones óptimas de reacción así como la estabilidad al pH y temperatura se determinaron utilizando el diseño de superficie de respuesta de Doehlert. La actividad del extracto enzimático presentó un pH y temperatura óptima de 60 °C y pH 6.0, respectivamente. Presentó una gran estabilidad en un amplio rango de valores de pH y temperaturas. Entre de los inhibidores de proteasas y metales estudiados, el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y el catión  $Hg^{+2}$  inhiben la actividad proteolítica indicando la presencia de serin-proteasas tiol-dependientes con actividad queratinolítica. El extracto enzimático demostró una alta estabilidad frente a agentes tensioactivos, agentes blanqueadores, y solventes orgánicos. Por medio de SDS-PAGE acoplado a zimograma se observó que el extracto enzimático estaba compuesto por dos proteasas, presentando sólo una de ellas actividad queratinolítica.

## **Introducción**

Las enzimas queratinolíticas son producidas generalmente en fermentación sumergida por una amplia gama de hongos y bacterias (Onifade et al., 1998). Esta producción se encuentra influenciada en gran medida por los componentes del medio de cultivo, especialmente de las fuentes de carbono y nitrógeno, y por otros factores tales como la densidad de inóculo, el oxígeno disuelto, pH inicial y tiempo de incubación. Esencialmente, cada microorganismo tiene sus propias condiciones especiales para la máxima producción enzimática (Puri et al., 2002).

La potencial aplicación comercial de las enzimas depende de una producción en altos niveles, a costos bajos o moderados. El diseño de un medio adecuado para dicha producción es de suma importancia debido a que la composición de éste influye en la concentración final del producto, el rendimiento y la productividad volumétrica. Por lo tanto, detectar y optimizar cuáles son los componentes que afectan esta producción son la principal tarea para poder implementar un proceso biológico.

La estrategia de optimización clásica y más comúnmente utilizada es la optimización de una variable a la vez (*one variable at a time*), donde cada parámetro se optimiza mediante la variación del mismo, mientras que los demás factores se mantienen en un nivel constante (Joo & Chang, 2005; Khardenavis et al., 2009). Esta metodología no sólo resulta ser tediosa, sino que también puede conducir a una mala interpretación de los resultados, sobre todo porque los efectos de la interacción entre los diferentes factores se pasan por alto. Sin embargo, puede tomarse como punto de partida para llevar a cabo la optimización (Wenster-Botz, 2000).

Las limitaciones que presenta la metodología *one variable at a time* pueden ser subsanadas mediante el empleo de diseños factoriales y la metodología de superficies de respuesta (RSM). El diseño de Plackett-Burman (PB) es un diseño factorial fraccional que permite estudiar el efecto de un gran número de variables de proceso con relativamente pocos experimentos. Como todo diseño fraccionario, no permite determinar las interacciones entre los distintos factores estudiados. Los factores que resulten significativos en el diseño factorial fraccionario, se utilizan luego para la

## *Optimización de los cultivos líquidos*

realización de diseño factorial completo o de superficies de respuesta (RSM) (Plackett & Burman, 1946).

La RSM es una herramienta útil para el estudio de los efectos de varios factores que influyen en la respuesta mediante la variación de forma simultánea de los mismos, llevando a cabo un número limitado de experimentos. La RSM puede definirse entonces como un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varios factores de carácter cuantitativo. En el presente trabajo se utilizó el Diseño Compuesto Central Rotable (CCDR). Este diseño se presenta como alternativa a los diseños factoriales  $3^k$  y presenta una serie de propiedades que lo hace ser uno de los más utilizados para ajustar superficies de respuesta de segundo orden (Herrera & Wilmer, 2000).

## *Optimización de los cultivos líquidos*

### **Materiales y métodos**

#### **Microorganismo y producción de inóculo**

La cepa de trabajo *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 fue repicada en erlenmeyers de 100-ml conteniendo APG a fin de producir conidios para el inóculo de los cultivos sumergidos. Luego de 10 días en oscuridad a 28 °C, los conidios se resuspendieron con una solución estéril (10 ml) de Tween 80 (0.05 % p/v) y contaron en cámara de Neubauer. La concentración promedio de conidios fue de  $3 \times 10^8$  conidios/ml.

#### ***Medio y condiciones de cultivo***

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 500-ml con 100 ml de un medio mineral base conteniendo residuo pelo como sustrato, cuya composición fue la siguiente (por litro): 10 g residuo pelo, 0.496 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.486 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.016 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.013 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0.010 g  $\text{MgCl}_2$ , y 0.11 mg  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.0). Los erlenmeyers fueron esterilizados en autoclave e inoculados con la suspensión de conidios para obtener una concentración final de  $2 \times 10^6$  conidios/ml en el medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 28 °C a 200 rpm en un agitador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). A intervalos regulares (6 h) se tomaron 5 ml de muestra de cada cultivo, los cuales se centrifugaron ( $5000 \times g$ , 20 min, 4°C) para retirar los restos de residuo pelo y biomasa. El sobrenadante (extracto enzimático) se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis. Todos los cultivos se realizaron por duplicado.

#### ***Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas***

Las muestras fueron analizadas en términos de actividad proteolítica y queratinolítica, utilizando azocaseína y azoqueratina como sustratos, siguiendo los protocolos detallados en el capítulo 2. El contenido de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

#### ***Optimización de los componentes del medio y de ciertos parámetros físicos utilizando la metodología de variación de una variable en el tiempo (one variable at a time)***

## *Optimización de los cultivos líquidos*

### *-Efecto de la adición de diferentes agentes reductores al medio de cultivo*

Los agentes reductores que se estudiaron fueron: Tioglicolato de sodio (Merck), clorhidrato monohidrato de L-cisteína (Biopack) y Sulfito de sodio (Anedra), cada uno en una concentración final de 5 mM. El pH inicial del medio se ajustó a 7.0

### *-Efecto de la concentración de los iones metálicos presentes en el medio mineral base*

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de estudiar el efecto de la concentración de los cuatro iones metálicos presentes en el medio mineral base ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ). Se probaron varias diluciones de la concentración original de los mismos, a saber: 1:2, 1:4, 1:10, 1:25 y 1:50. El pH inicial del medio se ajustó a 7.0.

### *-Efecto de la adición de ciertas sales en la producción enzimática*

Autores tales como Mizusawa et al. (1966) y Ferreyra et al. (2002) reportaron que la adición de ciertos metales como  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$  mejoraban de manera considerable la producción enzimática, por esta razón se decidió estudiar este efecto suplementando el medio original con cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) por un lado, manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) por otro y con una mezcla de ambos. La concentración final de estos iones en el medio de cultivo fue de 2 mg/l y el pH del medio se ajustó a 7.0.

### *-Análisis de la represión catabólica por carbono*

Con el objetivo de determinar el efecto de la glucosa sobre la producción enzimática, se realizaron cultivos conteniendo residuo pelo como fuente de carbono y energía (FCE) a los que se les adicionó glucosa (5 y 10 g/l). El pH inicial del medio se ajustó a 7.0 y la concentración de los metales originales del medio se utilizó en una dilución de 1:10 y en presencia de tioglicolato de sodio 5 mM.

### *-Efecto de la suplementación con fuentes de nitrógeno exógenas*

Se estudió el efecto de la suplementación del medio original con distintas fuentes de nitrógeno orgánicas (extracto de levadura, 2.23 g/l y urea, 0.40 g/l) e inorgánicas ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.10 g/l y  $\text{KNO}_3$ , 1.69 g/l). El pH inicial del medio se ajustó a



### *Optimización de los cultivos líquidos*

7.0, la concentración de los metales originales del medio se utilizó en una dilución de 1:10, se adicionó glucosa en una concentración de 5 g/l y tioglicolato de sodio en una concentración final de 5 mM.

#### *-Efecto de pH inicial y temperatura*

Los parámetros físicos evaluados fueron la temperatura y el pH inicial del cultivo. Se estudió el efecto de dos temperaturas diferentes de trabajo (28 °C y 37 °C) y cuatro pHs iniciales (5.0, 6.0, 7.0 and 8.0).

#### *-Efecto de la variación del inóculo*

El estudio del efecto de la concentración de inóculo se llevó a cabo variando la concentración en tres órdenes de magnitud. Se probaron concentraciones de  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  conidios/ml.

Los cultivos se llevaron a cabo por duplicado y en idénticas condiciones que las indicadas anteriormente, y a intervalos de 6 h se tomaron muestras de los mismos para su procesamiento y determinaciones analíticas.

#### ***Identificación de los factores significativos mediante el diseño de Plackett-Burman***

En base a los factores que resultaron significativos en el estudio de una variable a la vez, se decidió continuar estudiando el efecto de la variación de la concentración de cada uno de los metales originales presentes en el medio de cultivo, así como la concentración de glucosa y de extracto de levadura, y el pH. Se utilizó un diseño factorial fraccional de Plackett-Burman (PB) con el cual se estudió el efecto de n factores en n+1 experimentos. Cada uno de estos factores se estudió en dos niveles (alto y bajo, correspondientes a  $\pm 50\%$  ( $\pm 1$ ) respectivamente del punto central). En la Tabla 1 se presenta el diseño experimental (en términos de valores reales) donde se detallan los factores investigados así como los niveles en que fueron probados. Se realizaron además 3 réplicas del punto central, resultando en un total de 11 experimentos (7 factores, 8 experimentos y 3 réplicas del punto central). Los resultados fueron analizados mediante el programa Design Expert® (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA)

## *Optimización de los cultivos líquidos*

versión 8.0.7.1 trial version. Aquellos factores estadísticamente significativos (nivel de confianza del 90%,  $p < 0.10$ ) fueron seleccionados para su optimización por medio de un CCDR. Aunque el tiempo de cultivo no se consideró como una variable del diseño estadístico, la actividad de la enzima se evaluó después de 94, 110 y 118 h de incubación.

### ***Diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable***

La RSM es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas que resultan útiles para el modelado y análisis de los problemas en los cuales la respuesta de interés se encuentra influenciada por varias variables y el objetivo final es la optimización de esa respuesta (Myers et al., 2009). Luego de la selección de los factores estadísticamente significativos por el diseño de PB, se continuó con la siguiente etapa que era determinar los niveles óptimos de 3 variables: concentración de glucosa, concentración de  $\text{CaCl}_2$  y pH inicial. Para tal fin se utilizó un diseño compuesto central rotatable de 20 experimentos y cinco niveles codificados. Para los 3 factores estudiados este diseño consiste en una parte factorial (diseño  $2^k$  completo, en el que los niveles se encuentran codificados de forma habitual como  $\pm 1$ ), un punto central (nivel cero, repetido 6 veces) y una parte axial (seis puntos de estrella, es decir, puntos que tienen una distancia axial al centro de  $\pm\alpha$ , mientras que los otros dos factores se encuentran en el nivel cero). Para que el diseño sea ortogonal el valor que toma  $\alpha$  es de 1.68.

Para el estudio estadístico, cada variable independiente (factor) X se codificó como  $x_i$  de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$$

donde  $x_i$  es el valor codificado de la variable independiente  $i$ ésima,  $X_i$  el valor real de la variable independiente  $i$ ésima,  $X_0$  el valor real de la variable independiente  $i$ ésima en el punto central y  $\Delta X_i$  es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de los codificados.

Para un sistema de 3 factores, la ecuación del modelo resulta ser:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

### *Optimización de los cultivos líquidos*

donde  $Y$  es la respuesta predicha;  $b_0$  es el término constante;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  son los coeficientes lineales;  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$  son los coeficientes al cuadrado y  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  y  $b_{23}$  son los coeficientes de interacción.

Los resultados fueron analizados mediante el programa Design Expert® 8.0.7.1. El modelo permite la evaluación de los efectos de los términos lineales, cuadráticos y los coeficientes de interacción de las variables independientes sobre las variables dependiente. La significancia estadística de los coeficientes de regresión se determinaron mediante una prueba de  $t$  de Student's y la ecuación del modelo de segundo orden se determinó mediante un test de Fisher. Las representaciones gráficas de las superficies de respuesta se elaboraron para ilustrar los principales efectos de interacción entre las variables independientes sobre la producción de las enzimas queratinolíticas (variable dependiente). Los valores óptimos de las variables seleccionadas fueron obtenidos mediante la resolución del polinomio de segundo grado, así como mediante el análisis de la grafica de contorno de la superficie (Myers et al., 2009).

Con el fin de validar el modelo, se definieron combinaciones de valores de las variables que resultaron significativas para realizar nuevos cultivos, los cuales se llevaron a cabo tal como se detalló más arriba y se determinó la actividad proteolítica. Por otro lado, se calcularon las actividades utilizando el polinomio generado del análisis estadístico y se compararon ambos valores.

### ***Caracterización bioquímica del extracto enzimático***

#### *-Efecto de inhibidores de proteasas, iones metálicos, solventes orgánicos y detergentes en la actividad enzimática*

A fin de investigar el efecto que producen ciertos compuestos químicos sobre la actividad enzimática, el extracto enzimático (EE) fue pre-incubado durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C) con inhibidores de proteasas: PMSF (2 mM), Iodoacetato (10 mM), EDTA (5 mM), 1,10-Fenantrolina (1 mM) y Pepstatina (100 µg/ml); con detergentes: SDS (0.5 % p/v), Tritón X-100 (0.5 % v/v) y Tween 20 (0.5 % v/v), así como también con solventes e iones: DMSO, Etanol, Metanol e Isopropanol (1 % v/v);

### *Optimización de los cultivos líquidos*

$\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$  (1 mM). Luego de la pre-incubación, se determinó la actividad proteolítica residual en las condiciones estándar de medida que se detallaron en el capítulo 2. El 100 % de actividad correspondió a la actividad de la enzima luego de 1 h de incubación a 25 °C en ausencia de cualquier compuesto químico.

#### ***-Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y la estabilidad enzimática. Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficies de respuesta.***

Se seleccionó el diseño experimental propuesto por Doehlert para estudiar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la enzima mediante las superficies de respuesta generadas a partir de este modelo. El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta en el que los puntos experimentales se eligen de forma tal que los mismos queden equidistantes de un punto central. Este diseño permite describir una región alrededor de una respuesta óptima y contiene  $n^2 + n + 1$  puntos donde  $n$  es el número de variables. Si se estudia el efecto de dos variables, como se hizo en este trabajo, deben estudiarse la respuesta en 7 puntos distintos, uno central y 6 distribuidos alrededor de él. La figura resultante en este caso es un hexágono y la cantidad de experimentos necesarios es 9 debido a que el punto central se realiza por triplicado para determinar la varianza propia del experimento (Figura 1).

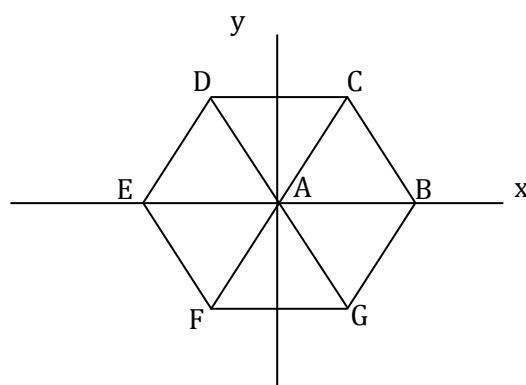


Figura 1.

Puntos del hexágono utilizados en el diseño de las superficies de respuestas

Las coordenadas del hexágono se denominan variables codificadas y a partir de ellas se calculan los valores reales de las variables  $x$  e  $y$ . Para ello se deben definir los límites del universo muestral, es decir, los valores máximos y mínimos de las variables a ensayar. En base a ellos se calculan los rangos para cada variable (real) y se calcula el

### *Optimización de los cultivos líquidos*

resto de los puntos basándose en una relación lineal entre el valor codificado y el valor real según la expresión:

$$x_{\text{real}} = x_{\text{codif}} \times (\Delta x_{\text{real}} / \Delta x_{\text{codif}}) + x_0$$

donde  $x_0$  es el valor real del punto central del diseño (el valor central del rango correspondiente),  $x_{\text{codif}}$  es el valor de la variable codificada,  $\Delta x_{\text{real}}$  y  $\Delta x_{\text{codif}}$  son las diferencias entre el valor más alto y el valor más bajo de los números reales y codificados respectivamente.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso actividad proteolítica) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo  $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_{11}x^2 + b_{22}y^2 + b_{12}xy$ . Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. Para nuestro caso, el análisis de regresión múltiple se realizó usando Mathcad 2001 software (Cavalitto & Mignone, 2007).

En el presente capítulo el diseño experimental de Doehlert fue aplicado en 2 casos: en el primer caso, se estudió la estabilidad frente al pH y la temperatura del EE y en el segundo caso se determinó el pH y la temperatura óptima de trabajo del EE. Para este diseño, el valor central (nivel cero) para el diseño experimental fue pH: 7.5 y T: 40 °C.

#### *Estabilidad enzimática*

Para el estudio de la estabilidad frente al pH y la temperatura, se determinó la actividad residual del EE bajo las condiciones estándar de medida luego de que el mismo fuera incubado 2 h en cada condición elegida. El rango de temperatura de trabajo fue de 20 °C a 60 °C y el pH varió en un rango de 3.0-12.0 utilizando una mezcla de buffers conteniendo Glicina (Gly), ácido morfolinoetansulfónico (MES) y Tris (todos presentes en una concentración 20 mM).

#### *pH y temperatura óptima*

En este caso, la actividad enzimática se determinó en cada una de las condiciones establecidas por el diseño estadístico. El rango de temperatura abarcado fue de 20 °C a 60 °C y el pH entre 6.0-12.0, usando la misma mezcla de buffers anteriormente mencionada.

## *Optimización de los cultivos líquidos*

### *-Efecto de la adición de polioles y de iones metálicos en la estabilidad térmica del extracto enzimático*

En este apartado se estudió la estabilidad del extracto enzimático frente a la temperatura, manteniendo el pH fijo (pH al que se llegó al finalizar el cultivo, pH 9.0). La estabilidad térmica se estudió incubando el extracto enzimático a diferentes temperaturas en un rango de entre 37 °C a 60 °C por un período de tiempo de 180 minutos. Durante los primeros 60 minutos de incubación, se tomaron alícuotas del extracto cada 15 minutos, y luego se tomaron cada 30 minutos hasta los 120 minutos para finalizar con una toma a los 180 minutos. A cada una de las alícuotas se le determinó la actividad proteolítica residual, utilizando azocaseína como sustrato. El 100 % de actividad enzimática corresponde a un extracto enzimático sin incubar (a 4 °C).

El efecto protector de ciertos polioles (propilenglicol, glicerol, sorbitol y polietilenglicol 4000; 10 % v/v o 10 % p/v) así como de los iones divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (como cloruros, 5 mM concentración final) contra la inactivación térmica del extracto enzimático se estudió en el rango de temperatura antes mencionado, expresando los resultados como la actividad proteolítica residual y tomando el 100 % de cada experimento como el extracto enzimático incubado a 4 °C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, expresando los resultados como la media  $\pm$  Ds.

### *-Estudio del efecto agentes reductores sobre la actividad proteolítica y queratinolítica*

Para realizar este estudio, se utilizaron los siguientes agentes reductores: L-cisteína (Biopack), Ditioneitol (DTT, Pharmacia biotech),  $\beta$ -mecaptoetanol (Pharmacia biotech), Sulfito de sodio (Anedra) y Ácido tioglicólico (Merck). Estos agentes se adicionaron a la mezcla de reacción en una concentración final de 1 mM y 5 mM y ambas actividades, proteolítica y queratinolítica fueron medidas tal cual se detalló en el capítulo 2.

### *Detección de actividades proteolítica y queratinolítica mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma*

### *Optimización de los cultivos líquidos*

El extracto enzimático fue sometido a un SDS-PAGE con su respectivo zimograma con la intención de determinar cuántas proteasas se encontraban presentes en el cultivo y cuáles de ellas presentaba además actividad queratinolítica. Las muestras desaladas se corrieron en condiciones desnaturalizantes utilizando un gel de acrilamida al 12 % de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970) en un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad) utilizando un kit de marcadores de peso molecular de bajo rango (14.1-97 kDa, Amersham Pharmacia Biotech). Se analizaron por SDS-PAGE tanto muestras hervidas como no hervidas. En la parte del gel destinada a zimograma sólo se sembró una alícuota de la muestra no hervida, en tanto que en la parte correspondiente al SDS-PAGE normal se sembraron ambas muestras. El buffer de siembra contenía  $\beta$ -mercaptoetanol en todos los casos. Luego de finalizada la corrida electroforética, una parte del gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 y en tanto que otra parte fue destinada a la realización de zimogramas con caseína y con queratina soluble como sustratos. Las partes destinadas a los zimogramas se sumergieron en Buffer Tris-HCl (100 mM, PH 9.0) conteniendo 2.5 % de Tritón X-100 durante 60 minutos, con agitación constante en un agitador orbital (New Brunswick Scientific) a 50 rpm y 28 °C con el fin de eliminar el SDS y así *refoldear* la enzima (García-Carreño et al., 1993). El detergente Tritón X-100 se retiró luego lavando el gel tres veces con Buffer Tris-HCl (100 mM, PH 9.0). Una porción del gel se incubó con una solución al 1 % p/v de caseína y otra con una solución a 1 % p/v de queratina soluble en el mismo buffer a 28 °C durante 30 y 90 min, respectivamente. La queratina soluble se obtuvo de acuerdo al protocolo de Wawrzkievicz et al. (1987). Finalmente, los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 para el análisis de las zimografías. El desarrollo de las zonas claras sobre el fondo azul indica la presencia de actividad proteolítica y queratinolítica de acuerdo al sustrato utilizado. Los marcadores de masa molecular utilizados fueron: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y  $\alpha$ -lacto albúmina (14.4 kDa).

### ***Microscopia de barrido (SEM)***

Muestras de residuo pelo obtenidas de los cultivos sumergidos de *P. lilacinum* fueron observadas por microscopia de barrido y comparadas con muestras sin el ataque

### *Optimización de los cultivos líquidos*

fúngico. Las muestras fueron liofilizadas y luego recubiertas con una capa de paladio y oro. La microscopia se llevó a cabo en un microscopio Jeol JSM-840 a un voltaje de aceleración de 25 kV.

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos en cada experiencia se analizaron mediante un análisis de varianza (*one way*-ANOVA) utilizando el test de LSD (*Fisher's least significant difference*) para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el programa Statgraphics PLUS<sup>®</sup>. Los resultados se presentan como la media de 3 determinaciones  $\pm$  DS.



## Resultados y discusión

### *Producción de enzimas queratinolíticas por P. lilacinum LPSC # 876*

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos cuando se cultivó *P. lilacinum* en sistema sumergido con residuo pelo como única fuente de carbono y nitrógeno (FCN). Se observa que tanto la producción de la actividad proteolítica como de la actividad queratinolítica a lo largo del tiempo de cultivo poseen un perfil similar. Ambas actividades aumentan en el tiempo alcanzando el máximo entre las 111-117 hs de cultivo (2.46 U azoc/ml y 25 U azoq/ml) llegan a un máximo y luego decrecen. Este hecho llevó a postular la posible presencia en el extracto crudo de una sola enzima responsable de ambas actividades y permitió utilizar la medida de actividad proteolítica como medida indirecta de la actividad queratinolítica para ensayos de caracterización enzimática, optimización de cultivos, etc. Durante todo el cultivo se mantuvo una relación entre ambas (Q/C) relativamente constante ( $11.32 \pm 1.06$ ). Sin embargo no debe olvidarse que estas queratinasas no dejan de ser proteasas y el descenso en la actividad luego de las 117 h puede deberse justamente a la autoproteolisis que sufre la misma.

Se observa que la síntesis extracelular de enzimas queratinolíticas está asociada al incremento en la concentración de proteínas solubles en el medio de cultivo, así como también al aumento continuo en los valores de pH. Estos hechos han sido reportados por varios autores para distintos microorganismos utilizando sustratos queratínicos (Riffel & Brandelli, 2006). El sólo hecho de un aumento en el pH del medio de cultivo puede ser utilizado como indicador del potencial queratinolítico que presenta el microorganismo debido al alto nivel de desaminación del sustrato, con la concomitante acumulación de amonio en el cultivo (Correa et al., 2010). Es más, Kornilłowicz-Kowlaska & Bohacz (2011) concluyen que la pérdida de masa del sustrato, la liberación de péptidos y amoníaco, la excreción al medio de sulfatos y la continua alcalinización del medio deben ser reconocidos como un conjunto homogéneo de factores que indican la actividad queratinolítica del microorganismo.

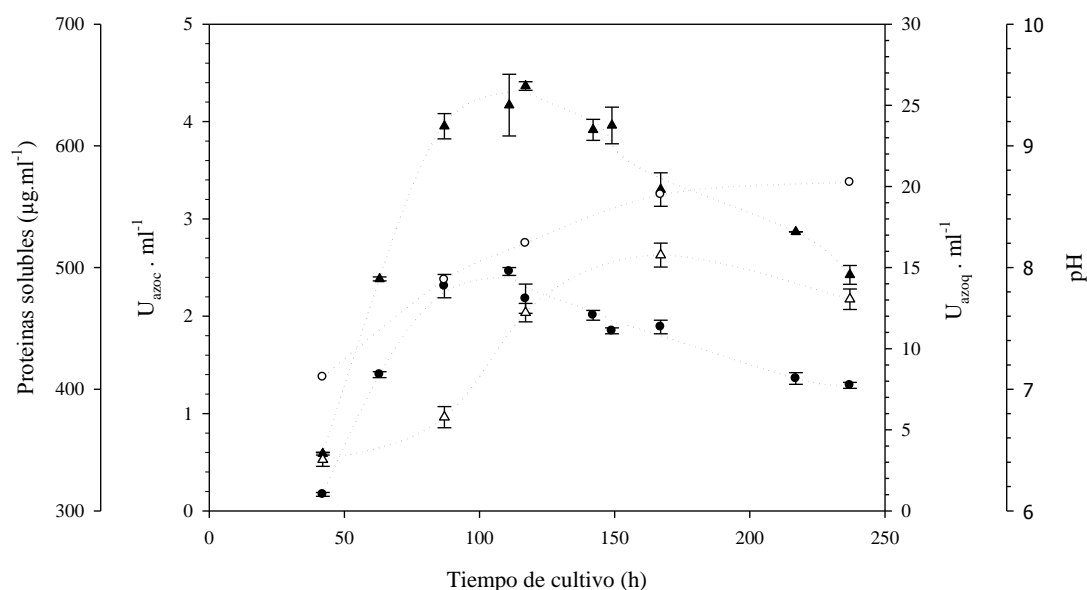


Figura 1. Perfiles de actividad proteolítica (●), actividad queratinolítica (▲), proteínas solubles (△) y pH (○) de *P. lilacinum* en cultivo sumergido con residuo pelo como única FCNyE.

Cinéticas similares de producción de enzimas queratinolíticas han sido reportadas para bacterias como *Bacillus subtilis* MTCC (9102) creciendo en presencia de harina de cuernos y para *Microbacterium* sp. kr10 creciendo en harina de pluma (Thys et al., 2006; Balaji et al., 2008), sin embargo cuando los microorganismos que se cultivan son hongos, se han observado cinéticas que toman mayor tiempo, por ejemplo para cultivos de *Aspergillus fumigatus*, *A. oryzae* y *Trichophyton vanbreuseghemii* la producción de enzimas queratinolíticas alcanza su máximo luego de 21 días de cultivo (Do et al., 2004; Moallaei et al., 2006).

### **Optimización de las variables de cultivo utilizando la metodología de variación de una variable en el tiempo (one variable at a time)**

#### **-Efecto de la adición de diferentes agentes reductores al medio de cultivo**

Además del tipo de empaquetamiento que presentan las cadenas de queratina, la presencia de puentes disulfuro le confiere mayor estabilidad mecánica y resistencia a la degradación. Las queratinasas son principalmente endoproteasas con un amplio espectro

## *Optimización de los cultivos líquidos*

de actividad y su capacidad para degradar la queratina ha sido asociada con la acción cooperativa de enzimas tales como las disulfuro reductasas (Brandelli et al., 2010) o a la presencia de ciertos agentes químicos (Kunert, 1976).

Los agentes reductores (Tioglicolato de sodio, cisteína, Sulfito de sodio, DTT, mercaptoetanol y glutatión) actúan de la misma manera que las enzimas disulfuro reductasa al cortar los puentes disulfuro presentes en las moléculas de queratina. Cuando esto sucede, la conformación de las moléculas cambia y se exponen una mayor cantidad de sitios para el ataque de las queratinasas, facilitando así la degradación de este sustrato (Vignardet et al., 2001).

El efecto de la adición de distintos agentes reductores sobre la producción de queratinasas se estudió adicionando los mismos en una concentración final de 5 mM. Los agentes reductores que se estudiaron fueron: Tioglicolato de sodio, clorhidrato monohidrato de L-cisteína y Sulfito de sodio y los resultados obtenidos expresados en % de actividad con respecto al cultivo control (100 %) se muestran en la Figura 2.

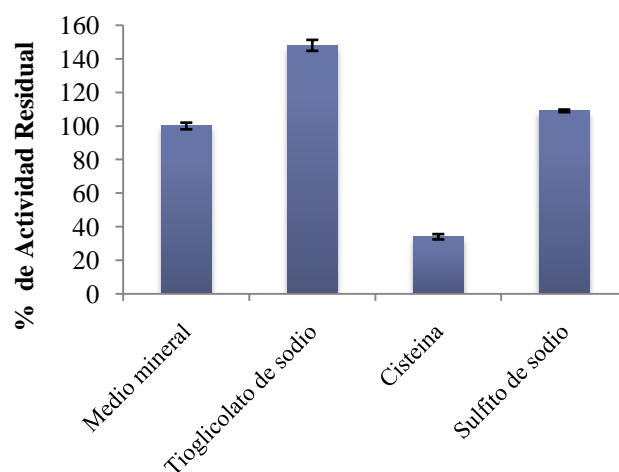


Figura 2. Efecto de diferentes agentes reductores sobre producción de enzimas queratinolíticas. El máximo de actividad reportada corresponde al máximo obtenido en cada cultivo a los 111-117 h de cultivo.

Se observa que la producción de enzimas queratinolíticas se vio favorecida por la presencia en el medio de cultivo del agente reductor tioglicolato de sodio. Con este

### *Optimización de los cultivos líquidos*

agente se logró un 50 % más de producción que el control. Con sulfito de sodio, la producción aumentó sólo un 10 %, en tanto que con cisteína la producción cayó a un 34 % con respecto del control. En la literatura existen escasos reportes sobre el estudio y uso de agentes reductores en los medios de cultivos para la producción de enzimas queratinolíticas. Prakash et al. (2010) estudiaron el efecto del agregado de sulfito de sodio en un medio de cultivo con plumas como FCN y encontraron que este agente reductor ejercía un efecto negativo en la producción enzimática (90 % con respecto al control), Liang et al. (2011) al estudiar el efecto de sulfito de sodio,  $\beta$ -mercaptoetanol y DTT encontraron que todos ellos disminuían la producción enzimática en medio con harina de pluma como FCNyE. Ramnani & Gupta (2004) al estudiar el efecto del glutatión sobre la producción de queratinasas por parte de *B. licheniformis* RG1 en un medio conteniendo plumas, encontraron que este agente no afectaba la producción enzimática.

#### *-Efecto de la concentración de los iones metálicos presentes en el medio mineral base*

Se estudió el efecto de la disminución de la concentración conjunta de los cuatro iones metálicos presentes en el medio de cultivo original sobre la producción enzimática. Se ensayaron varias diluciones de la concentración original: 1:2, 1:4, 1:10, 1:25 y 1:50, y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

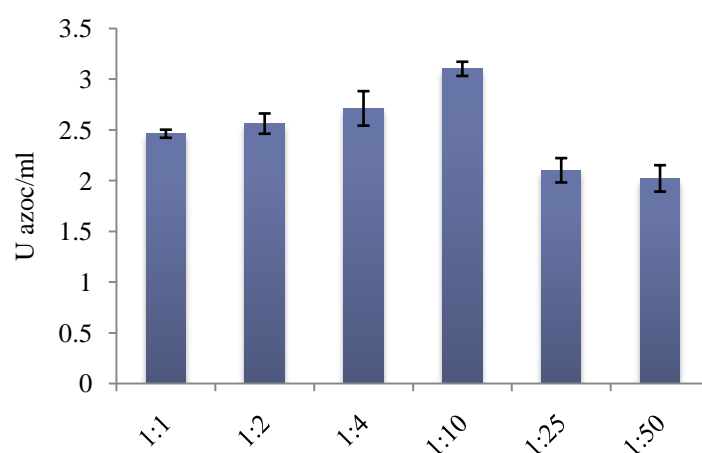


Figura 3. Influencia de diferentes diluciones de los iones metálicos presentes en el medio mineral en la producción de enzimas queratinolíticas. El máximo de actividad reportada corresponde al máximo obtenido en cada cultivo a los 111-117 h de cultivo.

*Optimización de los cultivos líquidos*

Del análisis de varianza realizado, se observó que a partir de las diluciones 1:4, el aumento de la producción enzimática era estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), llegando a un máximo con los metales diluidos 1:10 respecto a su valor original (aumento de un 26 %). Diluciones superiores a 1:10 disminuyeron la producción un 15 % y un 18 %, respectivamente. Un estudio similar fue realizado por Ferreyra et al. (2002) quienes obtuvieron la mayor producción de la enzima protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* cuando la concentración de los metales presentes en el medio de cultivo fue diluida en su conjunto en un factor de 1:85.

*-Efecto de la adición de ciertas sales en la producción enzimática*

Autores tales como Mizusawa et al. (1966) y Ferreyra et al. (2002) reportaron que la adición de ciertos metales como  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$  mejoraban de manera considerable la producción enzimática, por esta razón se decidió estudiar este efecto suplementando el medio original con cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) por un lado, manganeso ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) por otro y con una mezcla de ambos.

En base a los resultados obtenidos en el inciso anterior, donde se observó que la mayor producción se obtuvo cuando los metales se encontraban diluidos 1:10, se decidió probar una concentración de  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$  de 2 mg/l.

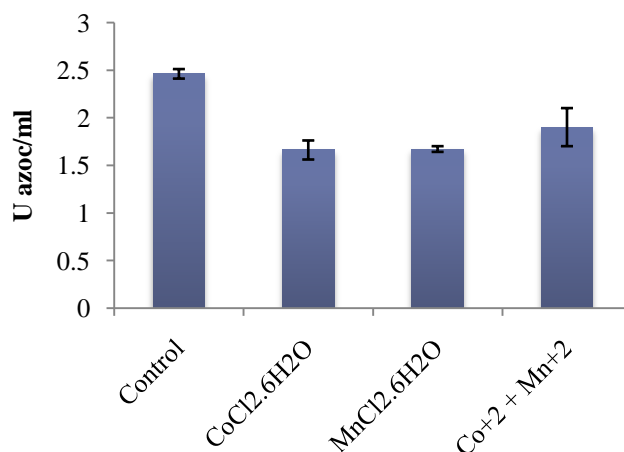


Figura 4. Efecto de la adición al medio de cultivo de los metales  $Co^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ . El máximo de actividad reportada corresponde al máximo obtenido en cada cultivo a los 111-117 h de cultivo.

### *Optimización de los cultivos líquidos*

La adición tanto de  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  o de una mezcla de ambos metales resultó en una disminución de la producción de enzimas queratinolíticas (Figura 4). Abidi et al. (2008) reportan un comportamiento similar para la producción de proteasas alcalinas por *Botrytis cinerea* y Fakhfakh-Zouari et al. (2010) reporta la disminución de la producción de queratinasas por *B. pumilus* A1 cuando el metal testeado es  $Mn^{+2}$ .

#### *-Análisis de la represión catabólica por carbono*

Los azúcares simples -como la glucosa- han sido reportados como represores de la síntesis de enzimas queratinolíticas. Para el caso de *B. licheniformis* PWD-1 la glucosa inhibe completamente la producción enzimática, en tanto que para el caso de *Bacillus* sp. MIR-99, no sólo la glucosa sino también el glicerol y la sacarosa reprimen la producción enzimática y para *Paracoccus* sp. WJ-98 ninguno de los azúcares experimentados resultó significativo (Wang & Shih, 1999; Lee et al., 2004; Patil et al., 2010).

Con el objetivo de determinar el efecto de la glucosa sobre la producción enzimática, se realizaron cultivos conteniendo residuo pelo como fuente de carbono, nitrógeno y energía (FCNyE) a los que se les adicionó glucosa (5 g/l y 10 g/l). Se observa (Figura 5) que la adición de glucosa incrementa la producción enzimática en un 400 % aproximadamente, y el incremento en la concentración de 5 a 10 g/l no incrementa significativamente la producción ( $p > 0.05$ ). Además del perfil de actividad proteolítica, se determinó la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo a lo largo del tiempo por el método de glucosa oxidasa de Wiener. Se observa que mientras hay glucosa en el medio de cultivo no hay producción de actividad proteolítica. Cuando la concentración de glucosa cae a cero, la actividad proteolítica comienza a ser detectable, indicando que en presencia de este carbohidrato existe represión catabólica.

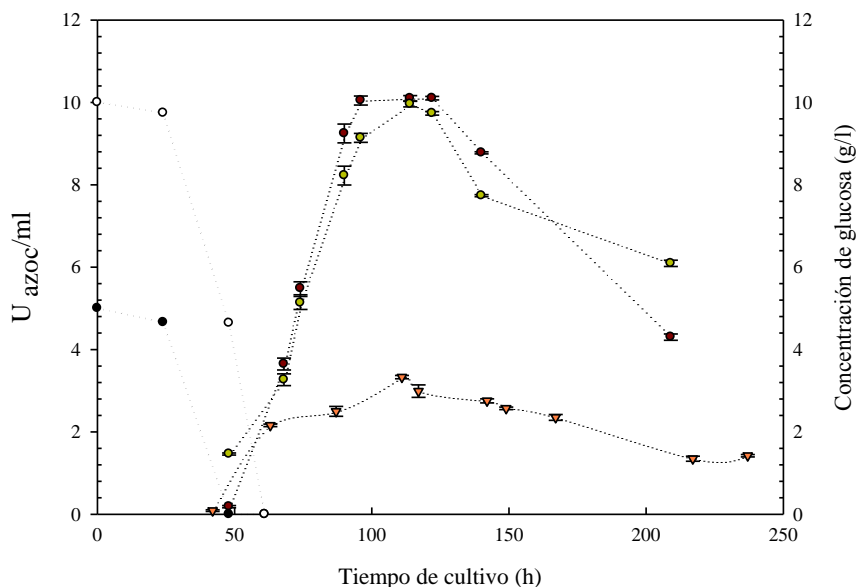


Figura 5. a) Perfil de actividad proteolítica en el tiempo variando la concentración de glucosa (g/l): (▼) Control, (●) 5 g/l de glucosa y (■) 10 g/l de glucosa. b) Perfil de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en el tiempo: (●) 5 g/l y (○) 10 g/L

Por otra parte, cuando los cultivos se realizaron en ausencia de residuo pelo utilizando glucosa o sacarosa (5 g/l) como fuente de carbono y energía y como fuente de nitrógeno distintos compuestos ( $KNO_3$ , Urea o  $(NH_4)_2SO_4$ ) se observó escaso crecimiento fúngico y nula actividad enzimática, lo que indicó que para el caso de esta cepa fúngica la producción de queratinasas es inducible y el agente inductor es el residuo pelo. La mayoría de las queratinasas reportadas son enzimas inducibles, con muy pocos reportes de queratinasas constitutivas como las reportadas por Gessesse et al. (2003) y por Manczinger et al. (2003). El aumento en la producción enzimática en presencia de glucosa es un hecho que ha sido observado por varios autores y ha sido atribuido al hecho de que estos microorganismos utilizan esta fuente de carbono (fácilmente asimilable) para crecer en biomasa sin producir enzimas y una vez agotada esta fuente comiencen a secretarlas (Malviya et al., 1992; Singh, 1997; Gioppo et al., 2009).

*Optimización de los cultivos líquidos*

*-Efecto de la suplementación con fuentes de nitrógeno exógenas*

Con el objetivo de estudiar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno se llevaron a cabo una serie de cultivos sumergidos donde se agregó cada una de las fuentes en una concentración final de 20 mM de nitrógeno. Se observa que cuando la suplementación del medio de cultivo se realiza con extracto de levadura, la producción enzimática se incrementó en 1.56 veces y en presencia de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  este incremento fue del 1.13 veces ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1). Con las restantes fuentes de nitrógeno (Urea y  $\text{KNO}_3$ ) se observa una disminución de la producción enzimática. A diferencia de ciertos reportes en los cuales se señala que la adición de una fuente de carbono y una de nitrógeno externas producen una disminución en la producción enzimática (Malviya et al., 1992; Gioppo et al., 2009), en el presente trabajo de tesis se observó que la presencia de ambas fuentes en el medio de cultivo produjeron una influencia acumulativa positiva sobre la producción de enzimas queratinolíticas ( $U_{\text{azoc/ml}} \sim 16$ ). Similares resultados fueron reportados por Hossain et al. (2007) donde la combinación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.1 % p/v) y de melasas (1 % p/v) producen un efecto positivo en la producción de queratinasas por *B. licheniformis* MZK-3 y por Lv et al. (2010) para la producción de queratinasas por *Chryseobacterium* L99 sp. nov utilizando como fuentes externas sacarosa y triptona.

Tabla 1. Efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum*. El máximo de actividad reportada en la tabla corresponde al máximo obtenido en cada cultivo a los 111-117 h de cultivo.

Fuentes de nitrógeno	Actividad proteolítica ( $U_{\text{azoc/ml}}$ )
Control	$10.22 \pm 0.3$
Extracto de levadura	$15.96 \pm 0.6$
Urea	$2.09 \pm 0.4$
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	$11.58 \pm 0.2$
$\text{KNO}_3$	$3.57 \pm 0.6$



*-Efecto de pH inicial y temperatura en la producción enzimática*

Parámetros físicos o ambientales tales como el pH inicial del medio, la temperatura de incubación, la velocidad de agitación y el tiempo de incubación afectan el crecimiento de los microorganismos y por ende la producción de las enzimas extracelulares (Abidi et al., 2008). En cuanto al tiempo de incubación se observó que el máximo de actividad se registró a las 111-117 h de cultivo. Se estudiaron dos temperaturas de incubación 28 °C y 37 °C, observándose que a 37 °C tanto el crecimiento del hongo como la actividad enzimática producida fue escasa, seleccionando de esta manera como temperatura para la producción enzimática 28 °C. Esta temperatura de crecimiento es similar a la reportada para *Vibrio* sp. kr2, *Lysobacter* sp., *Streptomyces* sp. y *Penicillium* sp. los cuales presentan una temperatura de crecimiento óptimo en el rango de los 20 °C-30 °C.

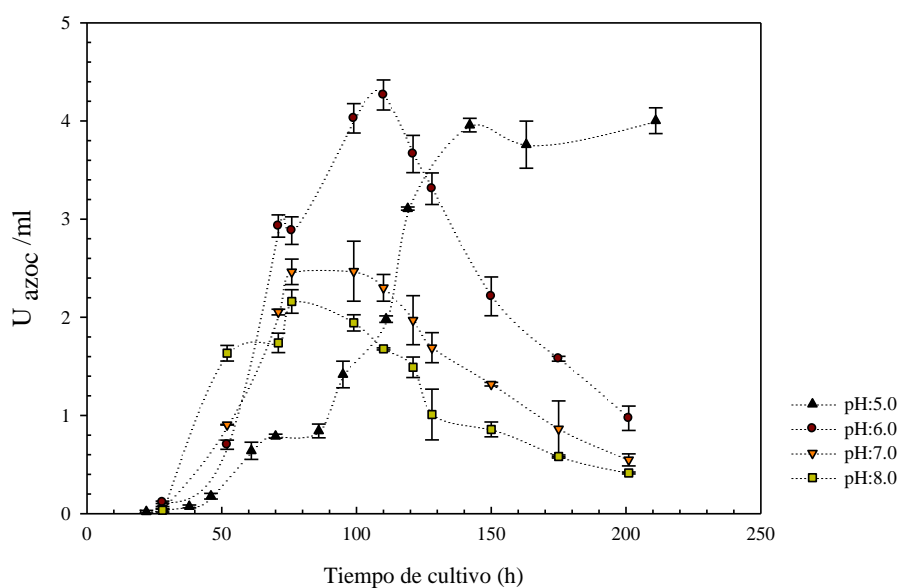


Figura 6. Perfil de actividad proteolítica en el tiempo variando el pH inicial del cultivo.

(▲) pH: 5.0; (●) pH: 6.0; (▼) pH: 7.0 y (■) pH: 8.0

El efecto del pH inicial sobre la producción enzimática se estudió en el rango de pHs comprendido entre 5.0-8.0. Se observa (Tabla 2 y Figura 6) que, en el rango de pH estudiados el hongo fue capaz de crecer y producir actividad, con un máximo a pH

*Optimización de los cultivos líquidos*

inicial de 6.0, donde la producción enzimática se incrementó en 1.7 veces con respecto al medio de cultivo inicial (4.23 U azoc/ml). pHs similares a éste han sido reportados para la producción de enzimas queratinolíticas de *Pseudomonas* sp. KP-364 (pH 6.5, (Chon & Kwon, 2001), *Bacillus pumilis* (pH 5.0-6.0, (Pissuwan & Swaminathan, 2001) y para *Fervidobacterium pennavorans* (pH 6.3, (Friedrich & Antranikian, 1996). Sin embargo, una gran mayoría de los microorganismos productores de queratinasas reportan un pH inicial neutro o ligeramente alcalino (Gupta & Ramnani, 2006).

Tabla 2. Efecto de la temperatura (°C) y del pH inicial del medio en la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum*. Los valores de actividad corresponden a las 111-117 h de cultivo. Los valores son la media de tres experimentos independientes ± DS

		Actividad proteolítica (U <sub>azoc</sub> /ml)
<i>T</i> (°C)		
	28	2.46 ± 0.04
	37	0.31 ± 0.05
<i>pH</i> inicial ( <i>T</i> :28°C)		
	5	1.35 ± 0.03
	6	4.23 ± 0.30
	7	2.46 ± 0.04
	8	2.16 ± 0.04

*-Efecto de la concentración del inóculo sobre la producción enzimática*

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto del inóculo se presentan en la Figura 7. Se observa que con el incremento en la concentración de inóculo hubo un aumento en la producción enzimática. Se observó que para una concentración de inóculo de  $2 \times 10^7$  el máximo de actividad se registró a tiempos menores a los observados para un recuento de  $2 \times 10^6$ . El máximo se observó a las 72 h de cultivo (6.0 U azo/ml) en tanto que cuando la concentración de esporos era de  $2 \times 10^6$  o  $2 \times 10^5$  el máximo fue a las 104 h aproximadamente.

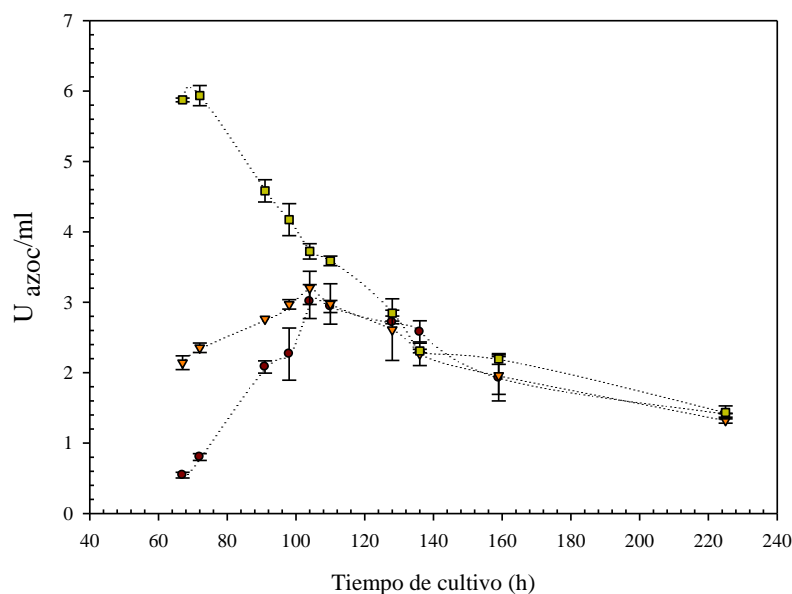


Figura 7. Perfil de actividad proteolítica en el tiempo variando la concentración inicial de inóculo.

(●)  $2 \times 10^5$ ; (▼)  $2 \times 10^6$  y (■)  $2 \times 10^7$

De este primer paso de optimización, utilizando la metodología de cambio de una variable por vez, fue posible definir las condiciones de cultivos de partida para la optimización estadística. Este nuevo medio de cultivo se definió como (por litro): 10 g residuo pelo, 0.496 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.486 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 g glucosa, 2.2 g extracto de levadura, dilución en 1:10 de la solución original de metales, 0.57g tioglicolato de sodio (pH inicial 6.0, 28 °C y recuento inicial de  $2 \times 10^7$  conidios/ml). A fin de validar el efecto individual de cada nuevo componente presente en el medio de cultivo y de cada condición cambiada, así como también con la intención de evaluar el incremento total en la producción enzimática se realizó un cultivo (por duplicado) siguiendo la metodología detallada en la sección de materiales y métodos, bajo las nuevas condiciones de cultivo, determinándose ambas actividades enzimáticas (proteolítica y queratinolítica), pH y proteínas solubles. El perfil de actividad proteolítica y queratinolítica a lo largo de este nuevo cultivo optimizado se muestra en la Figura 8.

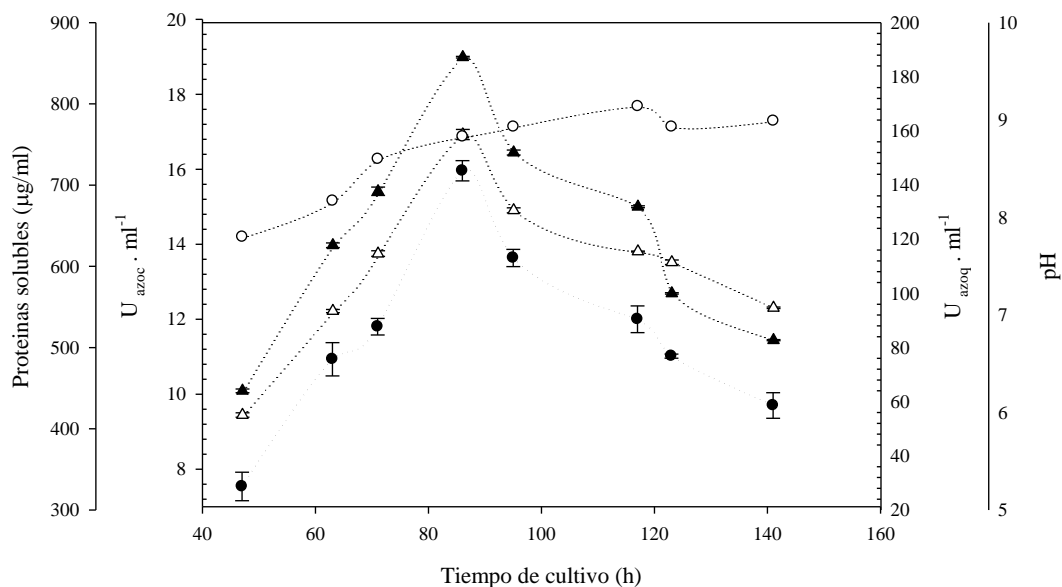


Figura 8. Perfiles de actividad proteolítica (●), actividad queratinolítica (▲), proteínas solubles (△) y pH (○) de *P. lilacinum* en cultivo sumergido optimizado por metodología de una variable por vez

Del la figura se desprende que la actividad proteolítica y la actividad queratinolítica aumentan considerablemente cuando *P. lilacinum* crece en el medio optimizado: con una fuente de carbono y de nitrógeno extra, pH inicial y concentración de iones metálicos más bajos, agregado de un agente reductor y con una mayor concentración de inóculo. En estas condiciones, la actividad producida se incrementa de 2.46 U azoc/ml en 111-117 h de cultivo a 15.96 U azoc/ml en 86 h de cultivo (un incremento global de 6.5 veces en la productividad). El pH final del medio de cultivo original fue de 8.7 y el del medio optimizado fue de 9.1 en concordancia con el aumento en la queratinolisis del residuo pelo.

### Identificación de los factores significativos mediante el diseño de Plackett-Burman

Como se mencionó anteriormente, gracias a la optimización mediante la metodología de una variable por vez se logró incrementar la producción de enzimas queratinolíticas en 6.5 veces. Sin embargo, la limitación que presenta esta metodología es la imposibilidad de detectar las posibles interacciones que pueden presentarse entre

*Optimización de los cultivos líquidos*

las distintas variables optimizadas. Por esta razón se decidió continuar con la optimización de los componentes del medio de cultivo utilizando herramientas estadísticas. El uso de estas herramientas para optimizar los componentes y las condiciones de medio de cultivo se ha ido incrementado en el campo de la biotecnología debido a que son fácilmente aplicables, presentan alta fiabilidad y validez.

Para el diseño factorial fraccional de Plackett-Burman se seleccionaron un total de 7 variables. La matriz del diseño experimental (expresado en valores reales) y la respuesta correspondiente a cada corrida (Actividad proteolítica, U azoc/ml) se presenta en la Tabla 3. A pesar de que se tomaron y analizaron las muestras a las 94, 110 y 118 h de incubación, la adecuación del modelo se calculó utilizando las actividades a las 94 h, donde la corrida nº 9 mostró el mayor nivel de actividad enzimática (18.8 U azoc/ml).

Tabla 3. Matriz experimental del diseño fraccional Plackett-Burman. En la tabla se incluyen los valores de actividad proteolítica (U azoc/ml) para cada experimento.

Orden	Variable							Act. Proteolítica (Uazoc/ml)		
	pH	CaCl <sub>2</sub> (mg/l)	MgCl <sub>2</sub> (mg/l)	ZnCl <sub>2</sub> (mg/l)	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (mg/l)	Glucosa (g/l)	Ext. lev. (g/l)	94 h	110 h	118 h
1	5.5	0.014	0.75	0.97	2.0	7.5	3.0	15.5	15.7	9.6
2	5.5	0.008	0.75	0.97	1.2	2.5	1.0	12.0	10.2	6.7
3	6.5	0.014	0.75	1.62	1.2	2.5	3.0	6.8	4.4	3.0
4	6.0	0.011	1.0	1.30	1.6	5.0	2.0	11.1	7.5	5.5
5	6.5	0.014	1.25	0.97	2.0	2.5	1.0	8.2	6.2	4.7
6	6.5	0.008	1.25	0.97	1.2	7.5	3.0	8.6	8.4	6.6
7	6.0	0.011	1.0	1.30	1.6	5.0	2.0	8.5	7.1	5.7
8	6.5	0.008	0.75	1.62	2.0	7.5	1.0	6.8	5.7	4.1
9	5.5	0.014	1.25	1.62	1.2	7.5	1.0	18.8	17.6	9.8
10	5.5	0.008	1.25	1.62	2.0	2.5	3.0	11.9	9.5	5.6
11	6.0	0.011	1.0	1.30	1.6	5.0	2.0	9.3	7.7	4.6

El grado de significancia estadística de cada una de las variables estudiadas se analizó a través de la prueba *t* de Student`s (ANOVA), utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.1$ . El análisis de los resultados obtenidos para el diseño PB

*Optimización de los cultivos líquidos*

demonstró que las variables significativamente estadísticas que afectan la producción enzimática fueron el pH inicial del medio de cultivo ( $p = 0.009$ ) y la concentración de glucosa ( $p = 0.1$ ). El  $r^2$  del diseño fue de 0.943, indicando que el 94.3% de los resultados experimentales pueden ser explicados por este diseño (Tabla 4). Si bien la concentración de  $\text{CaCl}_2$  resultó no ser estadísticamente significativa, al ser su  $p$  muy cercano al corte ( $p = 0.117$ ), se la seleccionó, junto con la concentración de glucosa y el pH inicial como variables a ser optimizadas por el diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable.

Tabla 4. Identificación de las variables significativas para la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum* utilizando el diseño de Plackett-Burman (donde *SS*: suma de los cuadrados; *df*: grados de libertad; *MS*: suma de los cuadrados y *F-value*: Número de Fisher)

	SS	df	MS	F-value	p-value
pH	97.35	1	97.35	36.53	0.009 <sup>a</sup>
$\text{CaCl}_2$	12.68	1	12.68	4.76	0.117 <sup>c</sup>
$\text{MgCl}_2$	5.11	1	5.11	1.92	0.260 <sup>c</sup>
$\text{ZnCl}_2$	0.00	1	0.00	0.00	0.997 <sup>c</sup>
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.87	1	1.87	0.70	0.464 <sup>c</sup>
Glucosa	14.50	1	14.50	5.44	0.100 <sup>b</sup>
Ext. de levadura	1.24	1	1.24	0.47	0.543 <sup>c</sup>
Error	7.99	3	2.66		
Total SS	140.74	10			

<sup>a</sup> efecto significativo negativo

<sup>b</sup> efecto significativo positivo

<sup>c</sup> no-significativo  $p > 0.1$

***Diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable (DCCR)***

Una vez seleccionadas las variables estadísticamente significativas por el diseño de PB, procedió a la optimización de los valores de dichas variables: concentración de glucosa y de  $\text{CaCl}_2$  así como del pH inicial. Para tal fin se utilizó un diseño compuesto central rotatable de 20 experimentos y cinco niveles codificados. El rango y los niveles de los factores estudiados se presentan en la Tabla 5. Los valores centrales (nivel cero) para este diseño experimental fueron: concentración de glucosa 5 g/l, concentración de

*Optimización de los cultivos líquidos*

CaCl<sub>2</sub> 0.0110 mg/l y pH inicial: 6.0. La matriz del DCCR con los valores obtenidos para la actividad proteolítica a las 94 h de cultivo, así como los valores predichos por el modelo se presentan en la Tabla 6.

Tabla 5. Valores de los factores en cada uno de los niveles estudiados en el CCDR

Factores/ Variable	Símbolo	Niveles				
		-1.68	-1.0	0	1.0	1.68
pH inicial	$x_1$	5.2	5.5	6.0	6.5	6.8
Glucosa (g/l)	$x_2$	0.8	2.5	5.0	7.5	9.2
CaCl <sub>2</sub> (mg/l)	$x_3$	6.5	8.3	11.0	13.7	15.5

Tabla 6. Diseño experimental del CCDR y valores observados para la actividad proteolítica (U<sub>azoc</sub>/ml)

Corrida	Actividad proteolítica (U <sub>azoc</sub> /ml)				
	pH	Glucosa (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (ng/l)	Observado	Predicho
1	6.5	2.5	8.3	10.1	12.3
2	6.0	5.0	11.0	17.9	16.7
3	6.5	7.5	13.7	13.5	12.4
4	5.2	5.0	11.0	8.3	9.9
5	6.5	7.5	8.3	15.1	14.8
6	5.5	2.5	8.3	10.4	10.7
7	6.0	5.0	11.0	16.9	16.7
8	6.5	2.5	13.7	11.2	10.3
9	6.0	0.80	11.0	5.3	4.2
10	5.5	2.5	13.7	6.3	5.7
11	6.0	5.0	11.0	15.1	16.7
12	5.5	7.5	13.7	19.4	16.3
13	5.5	7.5	8.3	27.4	21.7
14	6.8	5.0	11.0	8.4	8.0
15	6.0	5.0	11.0	17.2	16.7
16	6.0	5.0	6.5	25.9	24.2
17	6.0	5.0	11.0	14.7	16.7
18	6.0	5.0	15.5	14.9	17.9
19	6.0	9.2	11.0	12.9	15.2
20	6.0	5.0	11.0	18.5	16.7

El coeficiente de correlación múltiple  $r^2$  fue de 0.892. La máxima producción de enzimas queratinolíticas se obtuvo en la corrida n° 13 (27.4 U<sub>azoc</sub>/ml) a un pH inicial

*Optimización de los cultivos líquidos*

5.5, una concentración de glucosa de 7.5 g/l y de CaCl<sub>2</sub> de 8.3 ng/l, a las 94 h de cultivo, 28 °C, 200 rpm.

El ajuste de los valores de actividad proteolítica (U<sub>azoc</sub>/ml) se realizó por medio de un polinomio de segundo orden:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

donde  $Y$  es la respuesta predicha;  $b_0$  es la constante;  $b_1, b_2, b_3$  son los coeficientes lineales;  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  son los coeficientes al cuadrado y  $b_{12}, b_{13}$  y  $b_{23}$  son los coeficientes de interacción,  $x_1$  es el pH inicial,  $x_2$  la concentración de glucosa (g/l) y  $x_3$  es la concentración de CaCl<sub>2</sub> (g/l).

De esta manera, la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum* (U<sub>azoc</sub>/ml) se puede expresar en términos del siguiente polinomio:

$$Y = -368.7 + 132.5 x_1 + 15.7 x_2 - 8626.3 x_3 - 10.94 x_1^2 - 1.71 x_1x_2 + 562.9 x_1x_3 - 0.395 x_2^2 - 17.02 x_2x_3 + 211035.0 x_3^2$$

El análisis estadístico del estudio de optimización de enzimas proteolíticas (ANOVA) indicó que de las tres variables seleccionadas por el diseño de PB, la concentración de glucosa ( $x_2$ , g/l) y la concentración de CaCl<sub>2</sub> ( $x_3$ , g/l) poseen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción enzimática, también la poseen la interacción entre el pH inicial del cultivo y la concentración de glucosa ( $x_1x_2$ ) y los términos cuadráticos  $x_1^2$ ,  $x_2^2$  y  $x_3^2$  (Tabla 7 y Figura 9). En la Figura 9 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado para el modelo.



*Optimización de los cultivos líquidos*

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum*. (donde *SS*: suma de los cuadrados; *df*: grados de libertad; *MS*: suma de los cuadrados y *F-value*: Número de Fisher)

	SS	df	MS	F-value	p-value
$x_1$	3,55	1	3,5506	1,49890	0,275375
$x_1^2$	104,50	1	104,5046	44,11747	0,001166
$x_2$	119,40	1	119,4094	50,40967	0,000859
$x_2^2$	85,39	1	85,3924	36,04909	0,001841
$x_3$	38,96	1	38,9579	16,44638	0,009773
$x_3^2$	33,12	1	33,1183	13,98118	0,013443
$x_1x_2$	26,59	1	26,5940	11,22689	0,020314
$x_1x_3$	3,35	1	3,3534	1,41567	0,287529
$x_2x_3$	0,078	1	0,0779	0,03288	0,863241
Lack of Fit	38,96	4	9,7389	4,11135	0,076568
Pure Error	11,84	5	2,3688		
Total SS	467,2701	18			

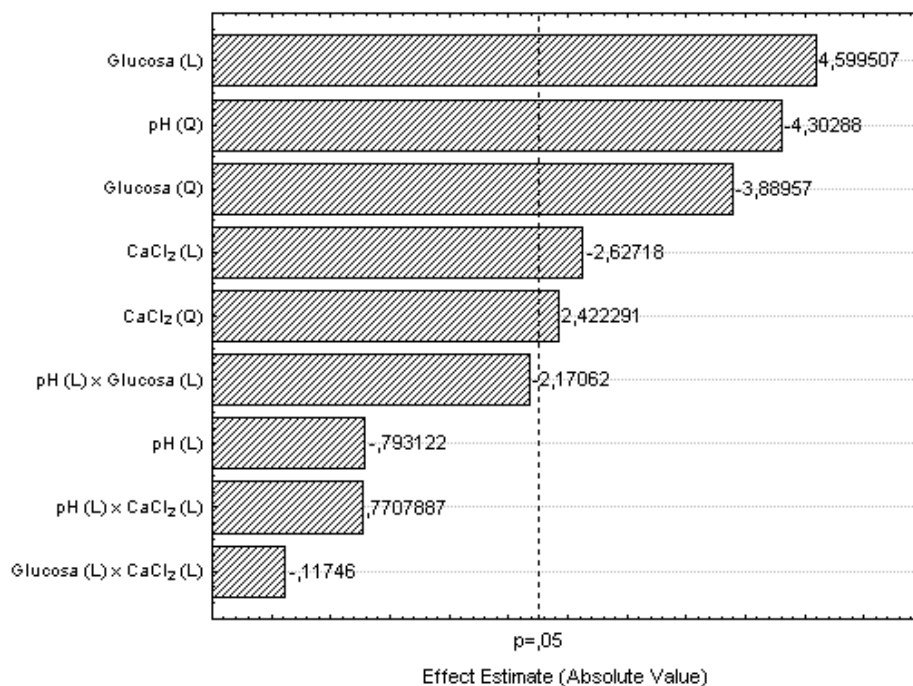


Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado

*Optimización de los cultivos líquidos*

La Figura 10 A) muestra la grafica de contorno de la superficie de respuesta que se obtuvo al estudiar la interacción entre el pH inicial y la concentración de glucosa presente en el medio, manteniendo la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fija en su nivel medio (nivel cero). Se observa que hay un incremento lineal en la producción enzimática con el aumento del pH inicial y de la concentración de glucosa hasta un valor de 6.10 y 9.0 g/l, respectivamente. El máximo de producción se observa en un rango pH inicial de 5.64-5.92 y una concentración de glucosa entre 6.4-7.8 g/l a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  fija en 0.0110 mg/l (11 ng/l). La naturaleza elíptica que muestra este gráfico de contorno demuestra la fuerte interacción entre el pH inicial y la concentración de glucosa (Tatineni et al., 2007)

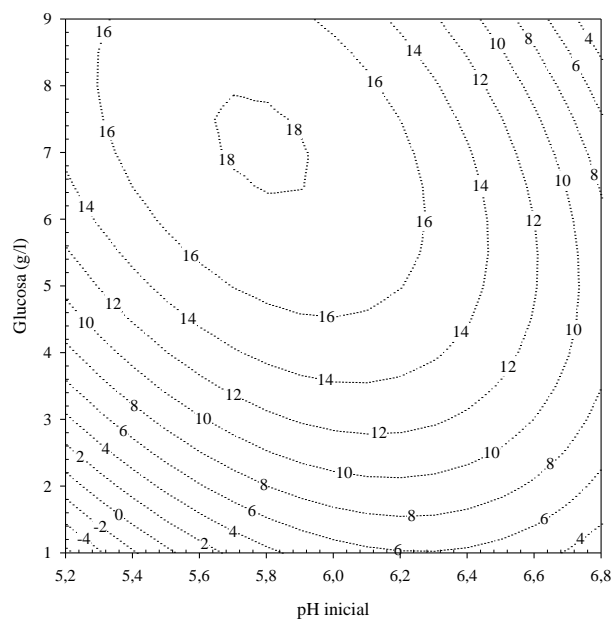


Figura 10 A) Grafica de contorno para la producción de enzimas queratinolíticas ( $U_{\text{azoc/ml}}$ ) como respuesta a la interacción de la concentración de glucosa (g/l) y el pH inicial a concentración de  $\text{CaCl}_2$  fija en 0.11 mg/l

Cuando se mantiene fija la concentración de glucosa en el nivel central (5 g/l) se observa que a medida que el pH inicial aumenta y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  disminuye en el medio, existe un aumento en la producción enzimática. Sin embargo, por encima de un pH inicial de 6.2 y concentraciones mayores a 0.0094 mg/l (9.4 ng/l) de  $\text{CaCl}_2$ , la producción enzimática disminuye considerablemente (Figura 10 B). Se observa un comportamiento similar cuando se varían la concentración de glucosa y de  $\text{CaCl}_2$

*Optimización de los cultivos líquidos*

manteniendo constante el pH inicial a 6.0. A medida que la concentración de  $\text{CaCl}_2$  disminuye en el medio de cultivo, la producción enzimática aumenta, con un máximo en el rango de concentraciones de glucosa entre 5.5-8.0 g/l (Figura 10 C). Ramnani & Gupta (2004) en el estudio sobre optimización de la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas queratinolíticas por parte de *Bacillus licheniformis* RG1 utilizando plumas como sustrato queratínico, reportan un efecto similar negativo con respecto a la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo. Por su parte, Anbu et al. (2007) encuentran que las concentraciones óptimas de  $\text{CaCl}_2$  y de glucosa para la producción de enzimas queratinolíticas por parte de *Scopulariopsis brevicaulis* son 10 g/l y 0.111 g/l, respectivamente.

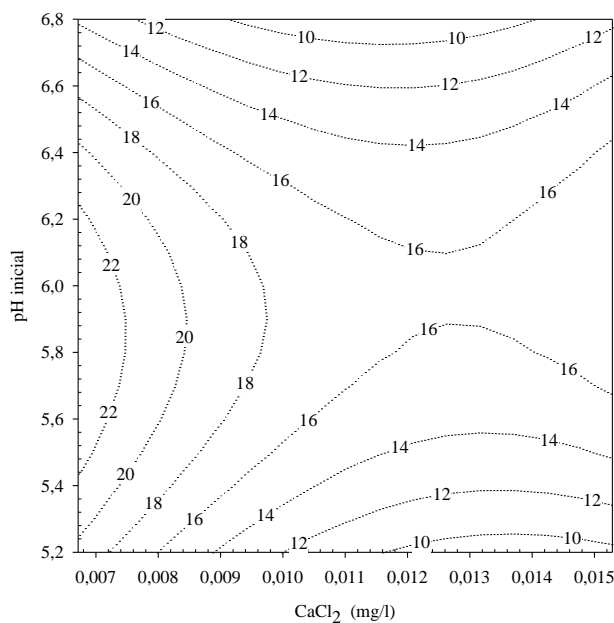


Figura 10 B) Grafica de contorno para la producción de enzimas queratinolíticas ( $U_{\text{azoc/ml}}$ ) como respuesta a la interacción entre el pH inicial y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (mg/l) a concentración de glucosa fija en 5g/l

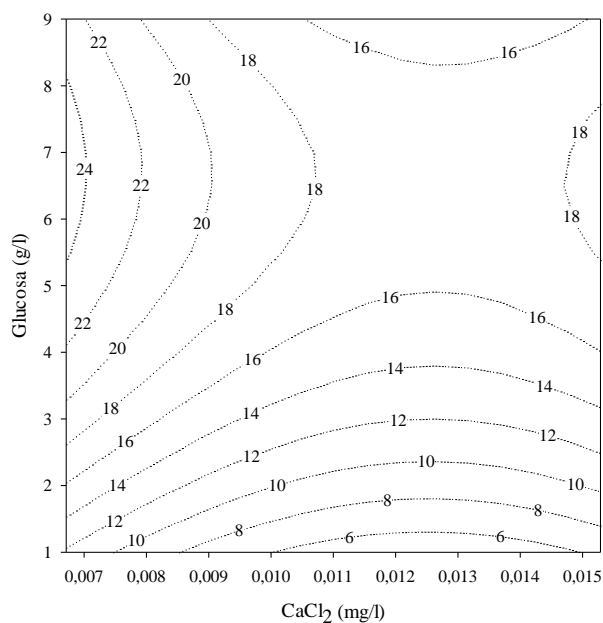


Figura 10 C) Grafica de contorno para la producción de enzimas queratinolíticas ( $U_{azoc/ml}$ ) como respuesta a la interacción entre la concentración de glucosa (g/l) y la concentración de  $CaCl_2$  (mg/l) a pH inicial de 6.0

El modelo planteado anteriormente predice que la máxima producción de enzimas queratinolíticas por parte de *P. lilacinum* (26.47  $U_{azoc/ml}$ ) se alcanza en un medio de cultivo cuya composición es (por litro): 10 g residuo pelo, 0.496 g  $NaH_2PO_4$ , 2.486 g  $K_2HPO_4$ , 0.0016 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.0013 g  $ZnCl_2$ , 0.0010 g  $MgCl_2$ , y 0.0065 mg  $CaCl_2$ , 2 g extracto de levadura y 7.10 g de glucosa (pH 5.6,  $2 \times 10^7$  conidios/ml), 200 rpm, 28 °C y 94 h de cultivo.

Con el fin de validar el desarrollo metodológico y estadístico llevado a cabo para la optimización de la producción de enzimas queratinolíticas, se eligieron cuatro composiciones aleatorias del medio de cultivo en donde se variaron las concentraciones de glucosa y  $CaCl_2$  así como también el pH inicial. Se calcularon las actividades enzimáticas predichas por el modelo para cada situación y se compararon con las actividades experimentales, calculando la diferencia porcentual entre ambos valores (Tabla 8). Se considera que para procesos biológicos, una diferencia de alrededor del 20 % entre los valores experimentales y los valores predichos por un modelo resultan aceptables para considerar a ese modelo válido (Kiran et al., 1999). Dado que las

*Optimización de los cultivos líquidos*

diferencias observadas son menores que ese valor, se puede concluir que el modelo propuesto describe de manera adecuada la influencia del pH inicial, la concentración de glucosa y calcio sobre la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum*.

Tabla 8. Experimentos llevados a cabo para validar el diseño estadístico propuesto

Medio	pH inicial	Glucosa (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (ng/l)	U <sub>azoc</sub> /ml Experimental	U <sub>azoc</sub> /ml Predicho	Diferencia (%)
1	6.0	5.0	8.3	19.9	20.1	0.8
2	6.5	3.0	5.0	17.8	20.7	14.2
3	6.0	10.0	5.0	20.4	25.1	18.6
4	5.2	2.0	5.0	15.0	13.1	12.6

El diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable permitió mejorar la producción enzimática en 10.8 veces con respecto al valor original obtenido cuando el hongo se cultivaba en un medio mineral mínimo con sólo residuo pelo como fuente de carbono, nitrógeno y energía, superando las optimizaciones realizadas por Thys et al. (2006) y Beg et al. (2003) para *Microbacterium* sp. KR10 22 y *B. mojavensis*, cuyos aumentos en la producción enzimática fueron de 3.6 y 4.2 veces, respectivamente.

***Caracterización bioquímica del extracto enzimático***

*-Efecto de inhibidores de proteasas, iones metálicos, solventes orgánicos y detergentes en la actividad enzimática*

En la tabla 9 se presenta el perfil de inhibición que presentó el extracto enzimático (obtenido a las 94 h de cultivo) luego de ser incubado con diferentes inhibidores de proteasas. Se observa que es fuertemente inhibido por PMSF (93 % de inhibición), ligeramente inhibido por Pepstatina, pero no fue inhibido por los demás inhibidores. El compuesto químico fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) es un inhibidor de serin-proteasas, en particular de subtilisin-serin proteasas. El alto porcentaje de inhibición observado por este compuesto indicaría la presencia en el extracto de este tipo de enzimas. Actualmente, la mayoría de las queratinasas reportadas pertenecen a este grupo de proteasas, siendo relativamente escasas las queratinasas reportadas pertenecientes al grupo de metaloproteasas y ninguna pertenecientes al grupo de aspartil

### *Optimización de los cultivos líquidos*

proteasas o de cistein- proteasas (Siezen & Leunissen, 1997; Bressollier et al., 1999; Gupta & Ramnani, 2006).

Entre los metales estudiados, se observa que el  $\text{Hg}^{+2}$  inhibe fuertemente la actividad enzimática luego de dos horas de incubación (94% de inhibición), observándose sólo una pequeña activación en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  ( $p < 0.05$ ). El  $\text{Hg}^{+2}$  es un reconocido agente oxidante de grupos tioles, y la inactivación de la actividad enzimática por parte de este metal sugiere que las enzimas presentes en el extracto enzimático presentan grupos  $-\text{SH}$  en la cercanía del sitio activo o en el sitio activo mismo (Daroit et al., 2008). La pequeña activación observada por los metales  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  puede ser atribuida a que dichos metales son capaces de actuar estabilizando la conformación de las enzimas por medio de interacciones iónicas, lo que también explicaría una posible protección frente a la inactivación térmica (Balaji et al., 2008; Sareen & Mishra, 2008). El extracto enzimático producido por *B. pumilis* A1 creciendo en medio sumergido en presencia de plumas presenta un incremento del 50 % en su actividad al incubarse con  $\text{Ca}^{+2}$ , en tanto que el  $\text{Mg}^{+2}$  no tiene efecto alguno sobre la actividad. Por otro lado, este extracto resulta inhibido por PMSF (5 mM, 0 % de actividad residual) y por EDTA (5 mM, 6.7 % de actividad residual). La inhibición por EDTA es indicativo de la importancia de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  en la estabilización de las enzimas presentes en el extracto enzimático de *B. pumilis* (Fakhfakh-Zouari et al., 2010), en el caso del extracto enzimático producido por *Streptomyces* sp.,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$  disminuyen su actividad enzimática en un 98.6, 65 y 78.5 %, respectivamente, en tanto que el  $\text{Mg}^{+2}$  aumenta la actividad en un 18 % con respecto al control (Tapia & Simoes, 2008). Del resultado obtenido del perfil de inhibición al utilizar inhibidores de proteasas, así como los obtenidos del estudio de los metales, se concluye que en el extracto enzimático –producto de la degradación fúngica del residuo pelo por parte de *P. lilacinum*- se encuentran serin-proteasas tiol-dependientes.

*Optimización de los cultivos líquidos*

Tabla 9. Efecto de ciertos inhibidores de proteasas, iones metálicos, detergentes y solventes orgánicos sobre la actividad proteolítica

Agente químico	Concentración	Actividad residual (%)
Control		100
<i>Inhibidores de proteasas</i>		
PMSF	2 mM	7.0 ± 0.0
Iodoacetato	10 mM	95.1 ± 4.7
EDTA	5 mM	99.6 ± 6.3
1,10-Fenantrolina	1 mM	100 ± 0.2
Pepstatina A	100 µg/ml	87.5 ± 5.5
<i>Iones metálicos</i>		
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	105.0 ± 1.2
Zn <sup>2+</sup>	1 mM	92.8 ± 1.4
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	102.9 ± 0.5
Hg <sup>2+</sup>	1 mM	6.0 ± 0.6
<i>Detergentes</i>		
Triton X-100	0.5 % (v/v)	97.7 ± 2.7
Tween 20	0.5 % (v/v)	98.5 ± 2.0
SDS	0.5 % (v/v)	75.9 ± 3.4
<i>Agentes oxidantes</i>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 % (w/v)	140 ± 2.3
	2 %	137 ± 0.3
	3 %	122.7 ± 4.0
Perborato de sodio	0.2 % (w/v)	99.7 ± 2.4
	0.5 %	97.6 ± 0.9
	1.0 %	90.8 ± 2.0
<i>Solventes orgánicos</i>		
DMSO	1 % (v/v)	106.0 ± 1.6
Etanol	1 % (v/v)	105.4 ± 4.0
Metanol	1 % (v/v)	117.0 ± 2.9
Isopropanol	1 % (v/v)	98.9 ± 1.7

*Optimización de los cultivos líquidos*

Otra característica destacable del extracto enzimático de *P. lilacinum* es la estabilidad que éste presentó en presencia de detergentes aniónicos como el SDS y no iónicos como Triton X-100 y Tween-20, solventes como DMSO, Etanol, etc. No existe un comportamiento regular en cuanto a la estabilidad frente a este tipo de agentes químicos en la familia de queratinasas, por ejemplo, un incremento en la actividad enzimática en presencia de SDS fue reportada por Bressollier et al. (1999), mientras que una fuerte inactivación fue reportada por Böckle et al. (1995) y también por Mitsui et al. (2004). Para el caso del solvente orgánico DMSO un incremento en la actividad enzimática fue reportada por Korkmaz et al. (2004) y Tapia & Simoes (2008).

*-Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática*

Para estudiar el efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática se utilizó un diseño de superficie de Doehlert de 9 experimentos, con 5 niveles para el pH y 3 niveles para la temperatura (T °C). En la tabla 10 se presenta la matriz del diseño experimental con los valores de las variables independientes (T y pH) y el valor de la variable dependiente (% actividad residual). Los valores centrales (nivel cero, A) para este diseño experimental fueron pH 7.5 y temperatura 40 °C.

Tabla 10. Valores reales y el correspondiente valor de la variable dependiente (% actividad residual) para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática del extracto de *P. lilacinum*

	pH	T °C	Act. Residual (%)
A	7.50	40	93.4
A	7.50	40	89
A	7.50	40	92
B	12.00	40	45
C	9.75	60	3.25
D	5.25	60	4.5
E	3.00	40	104.4
F	5.25	20	106.4
G	9.75	20	104.4



*Optimización de los cultivos líquidos*

Los resultados de esta experiencia fueron utilizados para obtener un polinomio de segundo grado que expresa la actividad residual del extracto enzimático (% AR) luego de 2 h de incubación a una temperatura y pH dados. El polinomio obtenido es el siguiente:

$$\% A.R = 91.33 - 18.12 * pH - 55.43 * T - 18.83 * pH^2 - 46.15 * T^2 + 0.721 * pH * T$$

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA, Tabla 11) reveló que, en el rango estudiado de pH y temperaturas, tanto las variables lineales o independientes como los términos cuadráticos de cada una de ellas poseen un efecto significativo sobre la estabilidad enzimática del extracto enzimático. El valor de  $r^2$  de 0.963 indica que sólo un 4% del total de las variaciones observadas no pueden ser explicadas por este modelo estadístico.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática del extracto enzimático de *P. lilacinum*. Nivel de significancia del 95 %. (donde SS: suma de los cuadrados; df: grados de libertad; MS: suma de los cuadrados y F-value: Número de Fisher

	SS	df	MS	F-value	p-value
T (°C)	9264.06	1	9264.06	1790.73	0.0006
pH	1023.05	1	1023.05	190.76	0.005
T <sup>2</sup> (°C)	2600.28	1	2600.28	502.63	0.002
T pH	0.25	1	0.25	0.05	0.8464
pH <sup>2</sup>	432.44	1	432.44	83.59	0.0118
Lack of fit	484.202	1	484.202	93.60	0,0105
Pure error	103.467	2	51.733		
Total SS	13499.2	8			

En la Figura 11 se presenta la superficie de respuesta obtenida para la actividad enzimática residual como resultado de la interacción entre el pH y la temperatura. Se puede observar que el extracto enzimático resultó ser bastante estable en el rango estudiado, reteniendo más del 50 % de la actividad en cualquier condición por debajo ed 50 °C. Este tipo de experiencias donde se estudia la interacción de ambos parámetros sobre la estabilidad del extracto enzimático no resulta común en la literatura, haciendo

## Optimización de los cultivos líquidos

difícil la posibilidad de comparar con otras queratinasas el efecto conjunto que producen sobre la estabilidad de las mismas, el pH y la temperatura. Por lo general suele estudiarse el efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad del extracto enzimático por separado. Así, por ejemplo, a 40 °C el extracto enzimático producido por *B. pumilus* A1 retiene un 56 % de su actividad residual luego de 1 h de incubación, en tanto que a pH 9.0, el extracto enzimático retiene un 83.5 y un 3.4 % de actividad luego de 2 h de incubación a 50 y 60 °C, respectivamente (Fakhfakh-Zouari et al., 2010). Para el caso del extracto enzimático producido por la especie *Bacillus* sp. aislada de la cuenca amazónica, éste demostró ser relativamente estable luego de 1 h a 37 °C (40 % de actividad residual) en tanto que a 55 °C se inactiva completamente (Giongo et al., 2007).

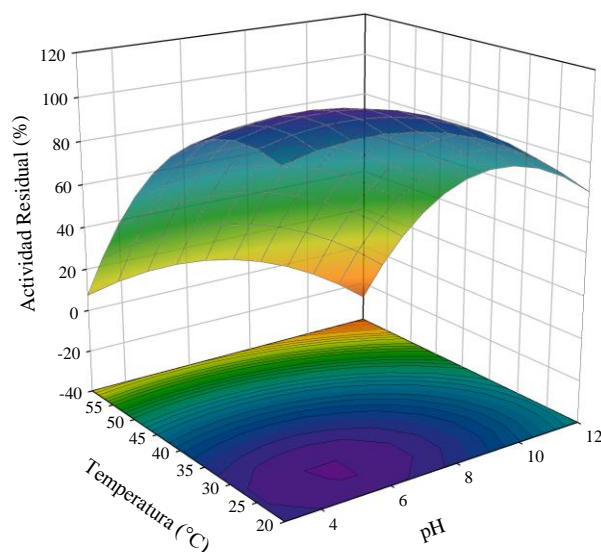


Figura 11. Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad del extracto enzimático de *P. lilacinum*. Superficie de respuesta obtenida representando el polinomio en el universo elegido por un diseño de superficie de respuesta de Doehlert

### -Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

Para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, se utilizó también el diseño de superficie de respuesta de Doehlert, pero en el rango de temperatura estudiado fue de 20 ° a 60 °C y el pH entre 6.0-12.0, utilizando azocaseína

*Optimización de los cultivos líquidos*

como sustrato. El diseño de superficie consistió en 9 experimentos, con 5 niveles para el pH y 3 niveles para la temperatura (T °C). En la tabla 12 se presenta la matriz del diseño experimental con los valores de las variables independientes (T y pH) y el valor de la variable dependiente (U azoc/ml). Los valores centrales (nivel cero, A) para este diseño experimental fueron pH 9.0 y temperatura 40 °C.

Tabla 12. Valores reales y el correspondiente valor de la variable dependiente (U azoc/ml) para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto de *P. lilacinum*

	pH	T °C	U azoc/ml
A	9.00	40	6.51
A	9.00	40	6.44
A	9.00	40	6.50
B	12.00	40	6.57
C	10.50	60	5.00
D	7.50	60	11.60
E	6.00	40	6.02
F	7.50	20	1.19
G	10.50	20	1.18

En este caso, el polinomio obtenido a partir del análisis estadístico para el cálculo de la actividad enzimática (*Act. Enz*) es el siguiente:

$$Act. Enz(U_{azoc/ml}) = 6.48 - 0.928 * pH + 4.12 * T - 0.188 * pH^2 - 2.23 * T^2 - 3.835 * pH * T$$

El valor de  $r^2$  que se obtuvo para este diseño experimental fue de 0.89. El análisis estadístico de los resultados (ANOVA, Tabla 13) muestra que, en el rango estudiado de pH y temperatura, tanto las variables lineales o independientes, así como la interacción entre ambas variables poseen un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad enzimática del extracto. De los términos cuadráticos, sólo el correspondiente a la variable temperatura resultó ser estadísticamente significativo (nivel de significancia del 95 %).

*Optimización de los cultivos líquidos*

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto enzimático de *P. lilacinum*. Nivel de significancia del 95 %. (donde SS: suma de los cuadrados; df: grados de libertad; MS: suma de los cuadrados y F-value: Número de Fisher

	SS	df	MS	F-value	p-value
T (° C)	50.6232	1	50.6232	11958.24	0.0001
pH	2.53001	1	2.53001	597.64	0.0017
T <sup>2</sup> (° C)	6.2472	1	6.2472	1475.72	0.0007
T pH	10.857	1	10.857	2564.65	0.0004
pH <sup>2</sup>	0.0537	1	0.0537	12.70	0.0705
Lack of fit	8.54427	1	8.54427	2018.33	0.0005
Pure error	0.00846	2	0.00423		
Total SS	78.885	8			

La superficie de respuesta obtenida para esta experiencia se muestra en la Figura 12. Se observa que para el caso del extracto enzimático de *P. lilacinum*, el pH y la temperatura óptima fueron de 6.0 y 60 °C, respectivamente.

Utilizando un diseño de superficie similar al utilizado en esta tesis, Tatineni et al. (2007) lograron establecer para el extracto enzimático de *Streptomyces* sp7 -obtenido de un cultivo con plumas como sustrato – un pH y una temperatura óptima de 11.0 y 45 °C, respectivamente. En el caso de los extractos enzimáticos de *Alternaria tenuissima* K2 y *Aspergillus nidulans* K7, se encontró que ambos extractos resultaron más activos en el rango de pHs alcalinos, con un pH óptimo para ambos de 8.5 y una temperatura óptima de 40 °C (Saber et al., 2010). Khardenavis et al. (2009), por su parte, reportan un pH óptimo de 10.0 y una temperatura óptima de 60 °C, respectivamente para el extracto enzimático de *Serratia* sp. HPC 1383. Se observa que, en general, el rango de pH óptimo de los extractos queratinolíticos se ubican en el rango neutro-alcalino (Bernal et al., 2006; Fakhfakh-Zouari et al., 2010; Mazotto et al., 2010) salvo el reporte de Cortez Lopes et al. (2011) para el extracto enzimático de *A. niger* cuyo pH óptimo es 6.5. Temperaturas óptimas en el rango entre 50 °C y 80 °C se reportan para extractos enzimáticos de *Nesterkononia* sp. (70 °C, Gessesse et al., 2003), *Trichoderma atroviride* (50 °C, Cao et al., 2008), *B. pumilis* A1 (Fakhfakh-Zouari et al., 2010), entre otras.

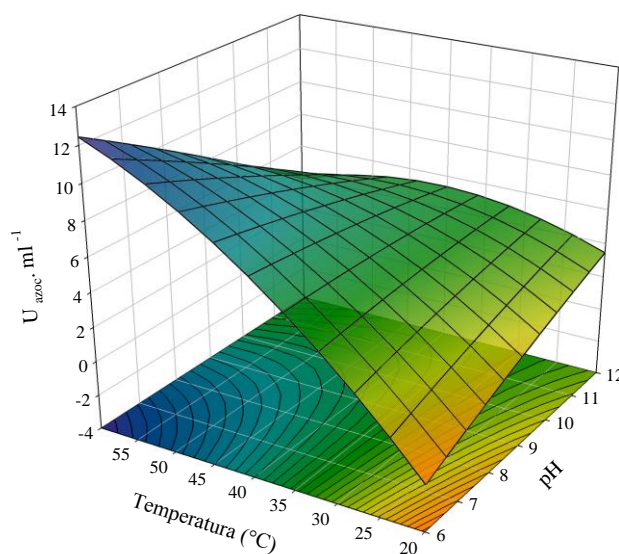


Figura 11. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto de *P. lilacinum*. Superficie de respuesta obtenida representando el polinomio en el universo elegido por un diseño de superficie de respuesta de Doehlert

*-Efecto de la adición de polioles y de iones metálicos en la estabilidad térmica del extracto enzimático*

En la Figura 12 A se puede observar que a temperaturas medias (37 °C y 40 °C) el extracto enzimático mantiene el 100 % de su actividad incluso luego de 3 h de incubación, en tanto que, a medida que la temperatura aumenta (50 °C, 55 °C y 60 °C) el extracto enzimático va perdiendo la actividad con el paso del tiempo. A temperaturas de 50 ° y 60 °C se observa que el tiempo necesario para reducir al 50 % la actividad inicial es de aproximadamente 70 y 10 min, respectivamente.

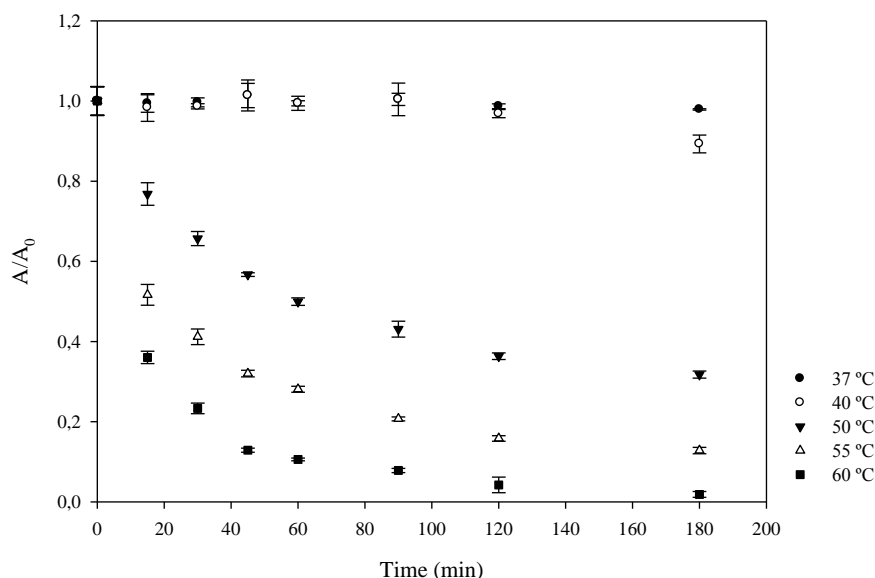


Figura12 A) Actividad proteolítica residual ( $A/A_0$ ) del extracto enzimático de *P. lilacinum* para cada a temperatura (●) 37 °C, (○) 40 °C, (▼) 50 °C, (△) 55 °C y (■) 60 °C

Al ver este marcado descenso en la actividad enzimática con el aumento de la temperatura fue que se planteó la posibilidad de utilizar ciertos aditivos como polioles y metales para el aumento de la termo-estabilidad del extracto crudo. Los aditivos que se probaron como posibles agentes protectores fueron propilenglicol, glicerol, sorbitol y polietilenglicol 4000 (10 % v/v o 10 % p/v) así como de  $\text{CaCl}_2$  y de  $\text{MgCl}_2$  (5mM). Se tomaron muestras a intervalos fijos de tiempo y se determinó la actividad proteolítica residual en las condiciones estándar de medida, tomando como 100 % la enzima a 4 °C. Por cuestiones de simplicidad en cálculos y teniendo en cuenta que el objetivo de la experiencia era estudiar el efecto de polioles y metales sobre la estabilidad térmica del extracto enzimático, se asumió que la cinética de inactivación a temperaturas superiores a 40 °C era de primer orden. Así, la actividad proteolítica residual se ajustó a la cinética no lineal de la forma:

$$At/A_0 = e^{-k_d t}$$

donde  $At$  es la actividad enzimática luego de transcurrido un tiempo  $t$ ,  $A_0$  es la actividad enzimática inicial,  $k_d$  es la constante de inactivación de primer orden y  $t$  es el tiempo.

*Optimización de los cultivos líquidos*

El tiempo de vida media del extracto enzimático se deduce a partir de la ecuación anterior y es igual a:

$$t_{(1/2)} = \ln(2)/k_d$$

Los valores de  $k_d$  y del tiempo de vida media del extracto enzimático a cada temperatura se presentan en la Tabla 14, donde se observa que 50 °C, el  $t_{(1/2)}$  del extracto enzimático fue de 70.5 minutos, en tanto que a 55 °C y 60 °C fue de 33 y 12 minutos, respectivamente. Comparado con otros extractos enzimáticos, el de *P. lilacinum* resultó ser similar al reportado por Khardenavis et al. (2009) cuya vida media a 60 °C fue de 10 min o menos estable que el reportado por Fakhfakh-Zouari et al. (2010) cuyo  $t_{(1/2)}$  a 60 °C fue de 20 minutos. Sin embargo, resultó ser más estable que el extracto enzimático producido por *Bacillus*, el cual luego de 20 minutos de incubación a 50 °C, solo retuvo un 40 % de su actividad inicial (Giongo et al., 2007) o más estable que el producido por la especie *Bradyrhizobium* sp. R-993, el cual luego de 2 h de incubación presenta menos del 10 % de su actividad residual a 55 °C (de Oliveira et al., 2010). Silveira et al. (2010) reportan un tiempo de vida media para el extracto enzimático de *Chryseobacterium* sp. kr6 de 13, 4.2 y 1.2 minutos, a 50 °C, 55 °C y 60 °C, respectivamente.

Tabla 14. Valores de la constante de inactivación y del tiempo de vida media para el extracto enzimático de *P. lilacinum* incubado a distintas temperaturas

Temperatura (°C)	$k_d$	$t_{(1/2)}$
50	0.0098	70.5 min
55	0.0208	33 min
60	0.058	12 min

El agregado individual de los polioles propilenglicol y glicerol al extracto enzimático demostró tener un efecto positivo en la estabilidad térmica al incrementar el tiempo de vida media en 1.7 y 1.6 veces, respectivamente, en tanto que el PEG 4000 sólo logró incrementar la estabilidad en 1.1 veces, a 50 °C. A esta temperatura,

*Optimización de los cultivos líquidos*

el tiempo de vida media pasó de ser 70 minutos a ser de 118 y 117 minutos en presencia de propilenglicol y glicerol, respectivamente. Los demás aditivos (sorbitol,  $\text{CaCl}_2$  y de  $\text{MgCl}_2$ ) no demostraron tener efecto alguno a esta temperatura. A 55 °C, se observaron resultados similares, con propilenglicol y glicerol estabilizando el  $t_{(1/2)}$  en 1.75 y 1.64 veces con respecto al control; con PEG 4000 incrementando en 1.1 veces ( $t_{(1/2)}$  de 33 a 35 minutos) y sin estabilización alguna en presencia de los restantes aditivos. Se puede observar en la Figura 12 B que a 55 °C, luego de 45 minutos de incubación, el extracto crudo sin aditivos retiene alrededor del 30 % de su actividad inicial, en tanto que en presencia de propilenglicol retiene el 54 %, a esta temperatura el  $t_{(1/2)}$  para el control fue de 33 min y en presencia de propilenglicol fue de 58 min. Cuando la temperatura se incrementó hasta los 60 °C se observó que todos los compuestos en mayor o menor medida ejercieron un efecto protector contra la inactivación térmica. Nuevamente el propilenglicol y el glicerol fueron quienes ejercieron mayor efecto estabilizante (1.45 veces y 2.17 veces, respectivamente), seguido por los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (1.3 veces), sorbitol (1.2 veces) y por ultimo PEG 4000 (1.1 veces) (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto de polioles y metales en la estabilidad térmica del extracto enzimático de *P. lilacinum* en términos de tiempo de vida media a distintas temperaturas

	Tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ , min)		
	50 °C	55 °C	60 °C
Control	70	33	12
Sorbitol	69	33	14
Propilenglicol	118	58	18
Glicerol	117	54	26
PEG 4000	76	35	13
$\text{CaCl}_2$	69	31	16
$\text{MgCl}_2$	75	36	16



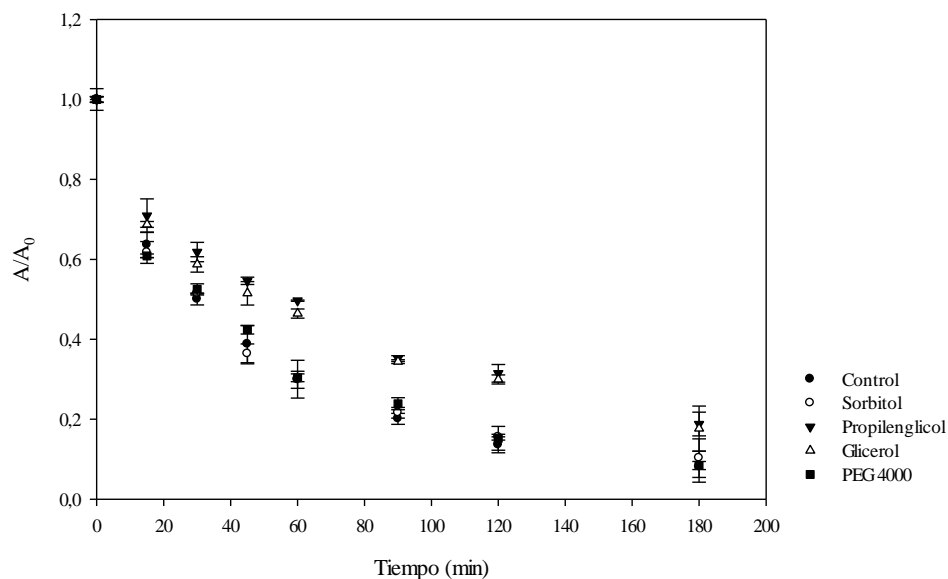


Figura 12 B. Efecto del agregado de polioles en la estabilidad térmica del extracto enzimático de *P. lilacinum* a 55 °C. (●) Control, (○) Sorbitol, (▼) Propilenglicol, (△) Glicerol y (■) PEG 4000

En la literatura relacionada a las enzimas queratinolíticas y de manera más amplia relacionada con las enzimas proteolíticas es conocido el efecto protector que ejercen contra la inactivación térmica los alcoholes polihídricos (polioles) tales como glicerol, sorbitol, polietilenglicol y los iones metálicos como  $Ca^{+2}$ . La adición de sorbitol mejoró la estabilidad térmica del extracto proteolítico de *B. cereus* BG1 en aproximadamente 2 veces a 60 °C (Ghorbel et al., 2003). Kelkar & Deshpande (1991) al estudiar el efecto de los polioles sobre la estabilidad térmica del extracto enzimático de *Sclerotium rolfsii* encontraron que en presencia de xilitol y sorbitol (3 M) se retiene el 100 % de actividad después de 7 h de incubación a 60 °C, en tanto que sin aditivos la vida media del extracto a esa temperatura era de 30 minutos. Estudios similares a éste, relacionados al efecto protector de los polioles han sido reportados por Cobos & Estrada (2003) para una xylanasa de *Trichoderma reesei* QM 9414; por Bhosale et al. (1995) para una proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20 y por Bayouhd et al. (2000) también para una proteasa alcalina pero de *Pseudomonas aeruginosa* MN1, entre muchos otros autores. Silveira et al. (2010) reportan para el extracto queratinolítico de *Chryseobacterium* sp. kr6 un aumento del tiempo de vida medio en presencia de  $Ca^{+2}$  y

### *Optimización de los cultivos líquidos*

de  $Mg^{+2}$  a todas las temperaturas estudiadas. Por ejemplo, a 50 °C el  $t_{(1/2)}$  sin aditivos es de 13 minutos y se incrementa a 31.2 y 19 minutos en presencia de  $Ca^{+2}$  y de  $Mg^{+2}$  (5 mM).

El aumento en la estabilidad térmica por parte de los polioles está relacionado con el refuerzo que estos compuestos ejercen sobre las interacciones hidrofóbicas que se dan entre los aminoácidos no polares presentes en las moléculas de enzimas y con la modificación de la estructura del agua que rodea a estas moléculas (Back et al., 1979). El efecto del ion  $Ca^{+2}$  sobre la estabilidad térmica es atribuido al fortalecimiento de las interacciones intramoleculares y a la unión de este metal a sitios de autólisis. Por otra parte, se cree que el efecto protector de metales tales como  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  está relacionado con el mantenimiento de la conformación activa de la enzima a altas temperaturas (Durham et al., 1987).

#### *-Estudio del efecto agentes reductores sobre la actividad proteolítica y queratinolítica*

Para estudiar el efecto de ciertos agentes reductores sobre la actividad proteolítica y queratinolítica se utilizaron los siguientes compuestos: L-cisteína, ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol, sulfito de sodio y tioglicolato de sodio. Estos agentes se adicionaron a la mezcla de reacción (sustrato más enzimas) en una concentración final de 1 mM y 5 mM y ambas actividades, proteolítica y queratinolítica fueron medidas tal cual se detalló en el capítulo 2.

Las Tablas 16 y 17 muestran los valores de actividad enzimática para cada uno de los agentes reductores estudiados. Se observa que ninguno de los agentes reductores estudiados tuvo un efecto positivo sobre la actividad enzimática cuando se utilizó azocaseína como sustrato. En cambio, cuando el sustrato fue azoqueratina el sulfito de sodio incrementó la actividad enzimática en un 34 % (1 mM) y un 60 % (5 mM) respecto del control sin agentes reductores. Si bien el tioglicolato de sodio y el DTT mostraron un efecto positivo sobre la actividad, éste fue menor (4 % y 3%,  $p < 0.05$ ), en tanto que la cisteína y  $\beta$ -mercaptoetanol resultaron ser a altas concentraciones inactivadores de la actividad enzimática sobre queratina (Tabla 17). Kunert (1992) atribuye este comportamiento al contenido de cistina (puentes disulfuro) presente en el sustrato utilizado para la medida de actividad: cuando una proteína como la azocaseína -

*Optimización de los cultivos líquidos*

la cual no posee puentes disulfuro en su molécula- es utilizada como sustrato, la disminución de actividad enzimática puede deberse probablemente a la reducción de los puentes disulfuro presentes en el sitio activo de las enzimas. Sin embargo, cuando se utiliza un sustrato de naturaleza queratínica -los cuales presentan puentes disulfuro en su composición-, los agentes reductores aumentan la actividad enzimática debido a la reducción de los puentes disulfuro presentes en el sustrato por parte de estos agentes, haciendo que el sustrato sea más accesible al ataque de las enzimas (Gradišar et al., 2000; Balaji et al., 2008). La actividad enzimática del extracto de *Serratia* sp. HPC 1383 en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (5 mM) disminuye su actividad en un 34 % cuando el sustrato es caseína (Khardenavis et al., 2009),

Tabla 16. Efecto de los agentes reductores sobre la actividad enzimática utilizando azocaseína como sustrato

	Concentración del agente reductor (mM)		
	0.0	1.0	5.0
Sulfito de Sodio	100	70	80
L-Cisteína	100	73	50
$\beta$ - mercaptoetanol	100	72	61
DTT	100	73	47.5
Tioglicolato de sodio	100	77	65.1

Tabla 17. Efecto de la presencia de agentes reductores sobre la actividad enzimática utilizando como sustrato azoqueratina

	Concentración del agente reductor (mM)		
	0.0	1.0	5.0
Sulfito de Sodio	100	134	161
L-Cisteína	100	104	87.8
$\beta$ - mercaptoetanol	100	85	94
DTT	100	96	102.7
Ácido Tioglicolato	100	114	104.3

*Detección de actividades proteolítica y queratinolítica mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma*

Con el fin de determinar el perfil enzimático del extracto producido por *P. lilacinum* utilizando sólo residuo pelo como FCN se procedió a realizar una

### *Optimización de los cultivos líquidos*

electroforesis (SDS-PAGE) acoplada a zimograma. Para los zimogramas se utilizaron dos sustratos: caseína y queratina, de tal manera que se pudo determinar tanto el contenido de proteasas como de queratinasas en el extracto. Se observó que *P. lilacinum* al crecer en un medio mineral con residuo pelo como sustrato produce al menos dos enzimas proteolíticas detectadas en el zimograma de caseína (una de alto peso molecular aparente y otra de aproximadamente 45 KDa), de las cuales sólo una de ellas resultó ser responsable de la actividad queratinolítica del extracto (Figura 13). Un resultado similar fue reportado por Huang et al. (2003) para el extracto enzimático de *B. pumilis*, el cual presentó una sola proteasa con capacidades depilatorias. Sin embargo, es más común en la literatura encontrar reportes donde los extractos enzimáticos contengan más de una enzima queratinolítica, por ejemplo, Agrebi et al. (2009) informan la presencia de al menos siete proteasas en el extracto enzimático de *B. pumilis* A26; Xie et al. (2009) informan la presencia de cinco proteasas en el sobrenadante de cultivos de *B. subtilis* AMR utilizando cabello humano como sustrato suplementado con extracto de levadura; de las cuales 3 poseían actividad queratinolítica revelada por zimograma con queratina soluble.

El perfil electroforético del extracto crudo hervido (calle 2) resultó ser diferente al sin hervir (calle 3), observándose en esta última calle una banda de alto peso molecular aparente concordante con los zimogramas de caseína y queratina. Es esta proteína la que luego se logró purificar y caracterizar, con un peso molecular de 37 KDa. Esta diferencia en el peso molecular observada en la electroforesis, al hervir o no la muestra sugiere que en este caso es el SDS el responsable de ciertos cambios conformacionales que sufriría la enzima dando como resultado una banda en la región de alto peso molecular. Muga et al. (1993) reportan un comportamiento similar en SDS-PAGEs de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

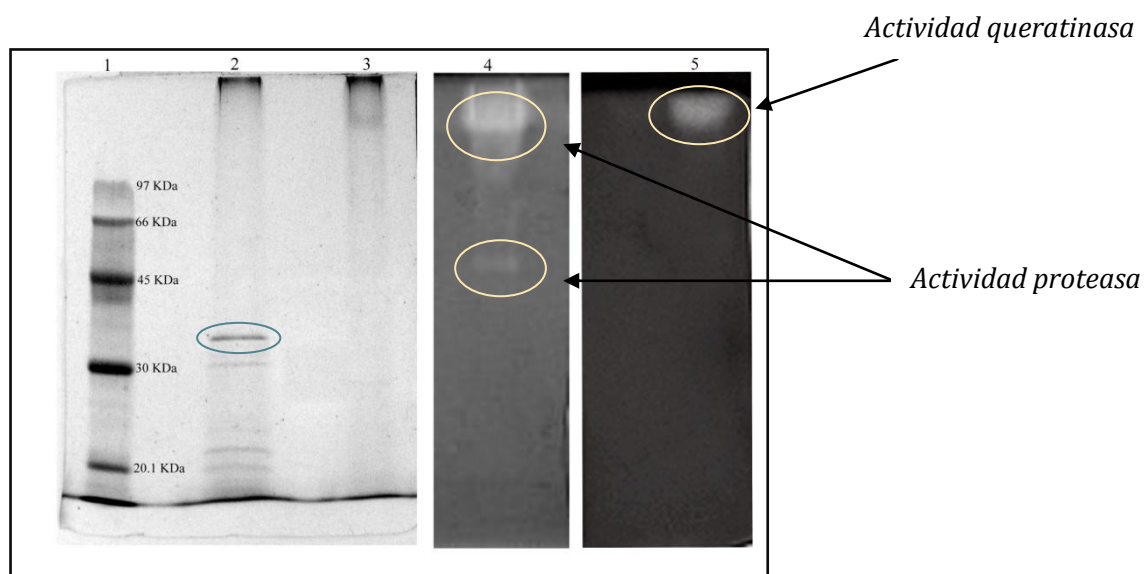


Figura 13. SDS-PAGE acoplado a zimogramas con caseína y queratina soluble como sustratos. Calles 1 Marcador de bajo peso molecular; 2 extracto enzimático hervido y 3 sin hervir; 4 zimograma con caseína y 5 zimograma con queratina soluble

### ***Microscopia de barrido (SEM)***

Para la realización de la microscopia electrónica de barrido, se tomaron muestras al 5<sup>to</sup> día de cultivo, se separaron los sobrenadantes de la biomasa y detritos por centrifugación y el pellet de biomasa y residuo pelo se liofilizó. Luego, estas muestras fueron recubiertas con una capa de paladio y oro a fin de hacerlas conductoras y se observaron en un microscopio Jeol JSM-840 a un voltaje de aceleración de 25 kV. En la Figura 14 A se observa la morfología del sustrato residuo pelo obtenido de un proceso de depilado conservador del pelo utilizando como agentes depilantes sulfito de sodio y cal donde la cutícula permaneció intacta, mientras que en los apartados B y C se observa el alcance de la degradación que sufrió este residuo en un cultivo sumergido luego de 5 días de incubación. Se observa una desorganización generalizada de la matriz y agregados fúngicos adheridos a la superficie.

*Optimización de los cultivos líquidos*

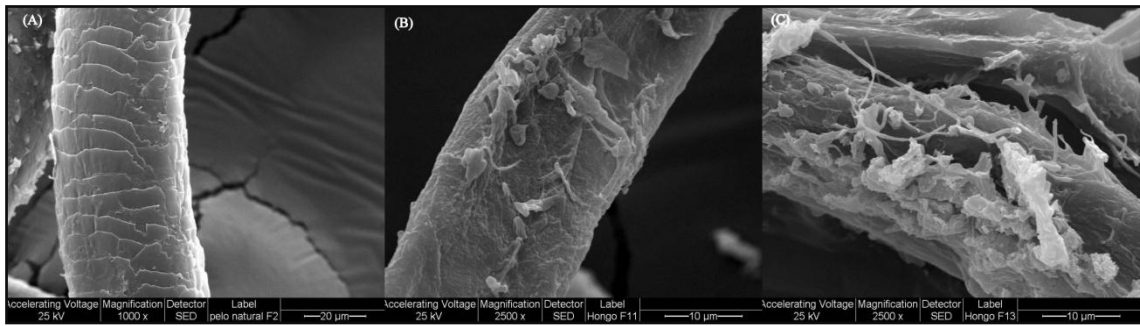


Figura 14. Microscopia electrónica de barrido de residuo pelo. A) Control, residuo pelo obtenido de un depilado conservador del pelo vacuno. B y C) Residuo pelo luego de 5 días de cultivo sumergido donde se observa la extensión de la degradación por parte de *P. lilacinum*.

## Conclusiones

En el presente capítulo se plantearon distintas estrategias para la optimización de la producción de enzimas queratinolíticas por *P. lilacinum*. Mediante la optimización por la metodología de una variable por vez se lograron encontrar ciertos parámetros y componentes del medio de cultivo, que fueron fijados como punto de partida para la optimización estadística. Así, gracias a esta primera metodología se pudo comprobar que era necesario un pH inicial menor a 7.0, que tanto glucosa como extracto de levadura aumentaban la producción y que la disminución de la concentración de los metales originales en un factor de 1:10 también ejercían un efecto positivo sobre la producción. Se logró definir un primer medio de cultivo optimizado y por medio de un diseño experimental de Plackett-Burman estudiar el efecto de cada uno de estos componentes, incluidos los metales en forma individual. De las 7 variables estudiadas sólo la concentración de glucosa y de  $\text{CaCl}_2$  y el pH inicial resultaron ser estadísticamente significativas. Así, manteniendo las demás variables en un nivel basal, se llevó a cabo la optimización de estas 3 variables mediante un diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable (DCCR). Se definió un medio de cultivo óptimo para la producción con la siguiente composición (por litro): 10 g residuo pelo, 0.496 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.486 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.016 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.013 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0.010 g  $\text{MgCl}_2$ , y 0.0065 mg  $\text{CaCl}_2$ , 2 g extracto de levadura y 7.10 g de glucosa y las siguientes condiciones pH inicial 5.6,  $2 \times 10^7$  conidios/ml, 200 rpm, 28 °C y 94 h de cultivo, mejorando la producción enzimática en un factor de 10.8 veces respecto al valor original obtenido con el medio mineral mínimo con residuo pelo como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. El uso de herramientas estadísticas para la optimización de la producción de enzimas queratinolíticas se encuentra ampliamente difundido, sin embargo es el primer reporte relacionado a la producción de estas enzimas por la especie *P. lilacinum* LPS # 876 (Cavello & Cavalitto, 2013).

La caracterización bioquímica del extracto enzimático demostró que éste posee una gran estabilidad en un amplio rango de valores de pH y temperaturas. Entre los inhibidores de proteasas y metales estudiados, el PMSF y el catión  $\text{Hg}^{+2}$  inhiben la actividad proteolítica indicando la presencia de serin-proteasas tiol-dependientes con actividad queratinolítica. Además demostró una alta estabilidad frente a agentes tensioactivos, agentes blanqueadores, y solventes orgánicos y por medio de SDS-PAGE

### *Optimización de los cultivos líquidos*

acoplado a zimograma se logró definir que el extracto enzimático estaba compuesto por dos proteasas, presentando solo una de ellas actividad queratinolítica.

En el capítulo 8 se discutirán las posibles aplicaciones tecnológicas del hidrolizado enzimático obtenido de la degradación del residuo pelo por *P. lilacinum*. Se plantea la potencial aplicación en la industria de los detergentes, en la recuperación de partículas de plata de residuos de placas radiográficas y la aplicación en el área de la agricultura como fertilizante orgánico.



**Bibliografía**

- Abidi, F., Limam, F., and Nejib, M. (2008) Production of alkaline protease by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biodetergent. *Process Biochemistry* 43:1202-1208
- Agrebi, R., Haddar, A., Hajji, M., Frikha, F., Manni, L., and Jellouli, K. (2009) Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization. *Canadian Journal of Microbiology* 55:1049- 1061
- Allpress, J.D., Mountain, G., and Gowland, P.C. (2002) Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9407. *Letters in Applied Microbiology* 34:342-
- Anbu, P., Gopinath, S.C., Hilda, A., LakshmiPriya, T., and Annadurai, G. (2007) Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology* 98:1298- 1303
- Back, J.F., Oakenfull, D., and Smith, M.B. (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18:5191- 5196
- Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R., and Seghal, P.K. (2008) Purification and characterization of an extracellular keratinase from hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2741- 2745
- Bayouhd, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib, A., Ammar, S., and Nasri, M. (2000) Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24:291- 295
- Beg, Q.K., Sahai, V., and Gupta, R. (2003) Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in bioreactor. *Process Biochemistry* 39:203- 209
- Bernal, C., Diaz, I., and Coello, N. (2006) Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. *Canadian Journal of Microbiology* 52:445- 450
- Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V., and Srinivasan, M.C. (1995) Thermostability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enzyme and Microbial Technology* 17:136- 139
- Böckle, B., Galunsky, B., and Müller, R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3705- 3710
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248- 254
- Brandelli, A., Daroit, D.J., and Riffel, A. (2010) Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1735- 1750

*Optimización de los cultivos líquidos*

- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. Applied and Environmental Microbiology 65:2570- 2576
- Cao, L., Tan, H., Liu, Y., Xue, X., and Zhou, S. (2008) Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. Letters in Applied Microbiology 46:389- 394
- Cavalitto, S.F. & Mignone, C.F. (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. Process Biochemistry 42:175- 179
- Cavello, I. & Cavalitto, S. (2013) Optimization of keratinolytic protease production by *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 as a sustainable management of tannery hair waste. Journal of American Leather Chemists Association 108:300- 310
- Chon, D. & Kwon, T. (2001) Isolation of keratinolytic protease producing microorganism and its cultivation condition. San'oeb misaengmul haghoeji Y 29:134- 141
- Cobos, A. & Estrada, P. (2003) Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. Enzyme and Microbial Technology 33:810- 818
- Correa, A.P., Daroit, D.J., and Brandelli, A. (2010) Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian environment. International Biodeterioration & Biodegradation 64:1- 6
- Cortez Lopes, F., Silva, L.A., Tichota, D.M., Daroit, D.J., Velho, R., Pereira, J., Corrêa, A.P., and Brandelli, A. (2011) Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. Enzyme Research 2011
- Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz, P.F., and Brandelli, A. (2008) Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 18:933- 941
- de Oliveira, A., de Oliveira, L.A., and Andrade, J.S. (2010) Production and some properties of crude alkaline proteases of indigenous central amazonian Rhizobia strains. Brazilian Archives of Biology and Technology 53:1185- 1195
- Do, J.H., Anderson, M.J., Denning, D.W., and Bornberg-Bauer, E. (2004) Inference of *Aspergillus fumigatus* pathway by computational genome analysis: tricarboxylic acid cycle (TCA) and glyoxilate shunt. Journal of Microbiology and Biotechnology 14:74- 80
- Durham, D.R., Stewart, D.B., and Stellwag, E.J. (1987) Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus sp* strain GX6638. Journal of Bacteriology 169:2762- 2768
- El-Gendy, M.M.A. (2010) Keratinase production by endophytic *Penicillium spp.* Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. Applied Biochemistry and Biotechnology 162:780- 794

*Optimización de los cultivos líquidos*

- Fakhfakh-Zouari, N., Haddar, A., Hmidet, N., Frikha, F., and Nasri, M. (2010) Application of statistical experimental desing for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilis* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry* 45:617- 626
- Ferreira, O.A., Cavalitto, S.F., Hours, R.A., and Ertola, R.J. (2002) Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Enzyme and Microbial Technology* 31:498- 504
- Friedrich, A.B. & Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennovorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2875- 2882
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., and Haard, N.F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214:65- 69
- 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- 524
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology* 32:513- 518
- Giongo, J.L., Lucas, F.S., Casarin, F., Heeb, P., and Brandelli, A. (2007) Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:375- 382
- Gioppo, N.M.R., Moreira-Gasparin, F.G., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., Souza, C.G.M., and Peralta, R.M. (2009) Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:705- 711
- Gradišar, H., Kern, S., and Friedrich, J. (2000) Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:196- 200
- Gupta, R. & Ramnani, P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview . *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21- 33
- Herrera, R. & Wilmer, F. (2000) Comparación teórica y práctica del diseño factorial  $3^3$  con el diseño de superficie de respuesta compuesto central rotatable. *Saber* 12:60- 65
- Hossain, M.S., Azad, A.K., Abu Sayem, S.M., Mostafa, G., and Mozammel Hoq, Md. (2007) Production and partial characterization of feather-degrading keratinolytic serine protease from *Bacillus licheniformis* MZK-3. *Journal of Biological Sciences* 7:599- 606
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., and Zhang, Y. (2003) Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology* 46:169- 173
- Joo, H.S. & Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soy meal, optimization and some properties. *Process Biochemistry* 40:1263- 1270

*Optimización de los cultivos líquidos*

- Kelkar, H.S. & Deshpande, M.V. (1991) Effect of polyols on the thermostability of pullulan-hydrolysing activity from *Sclerotium rolfsii*. *Biotechnology Letters* 13:901- 906
- Khardenavis, A.A., Kapley, A., and Purohit, H.J. (2009) Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia sp.* HPC 1383. *Waste Management* 29:1409- 1415
- Kiran, K.R., Karanth, N.G., and Divakar, S. (1999) Preparation of stearyl lactic acid ester catalyzed by lipases from *Rhizomucor miehei* and porcine pancreas optimization using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:579- 584
- Korkmaz, H., Hur, H., and Diyncer, S. (2004) Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* HK-1 from poultry waste. *Annals of Microbiology* 54:201- 211
- Kornilowicz-Kowalska, T. & Bohacz, J. (2011) Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* 31:1689- 1701
- Kunert, J. (1976) Keratin decomposition by dermatophytes II. Presence of S-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 16:97- 105
- Kunert, J. (1992) Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses* 35:343- 348
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680- 685
- Lee, Y., Kim, J., Kim, H., and Lee, J. (2004) Production and characterization of keratinase from *Paracoccus sp.* WJ-98. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9:17- 22
- Liang, J.D., Han, Y.F., Zhang, J.W., Du, W., Liang, Z.Q., and Li, Z.Z. (2011) Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *Journal of Applied Microbiology* 110:871- 880
- Lv, L.X., Sim, M.H., Li, Y.D., Min, J., Feng, W.H., Guan, W.J., and Li, Y.Q. (2010) Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov. *Process Biochemistry* 45:1236- 1244
- Malviya, H.K., Rajak, R.C., and Hasija, S.K. (1992) Purification and partial characterization of two extracellular keratinases of *Scopulariopsis brevicaulis*. *Mycopathologia* 119:161- 165
- Manczinger, L., Rozs, M., Vágvölgyi, C., and Kevei, F. (2003) Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:35- 39
- Mazotto, A.M., Lage Cedrola, S.M., Lins, U., Rosado, A.S., Silva, K.T., Chaves, J.Q., Rabinovitch, L., Zingali, R.B., and Vermelho, A.B. (2010) Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Letters in Applied Microbiology* 50:89- 96
- Mitsuiki, S., Ichikawa, M., Oka, T., Sakai, M., Moriyama, Y., Sameshima, Y., Goto, M., and Furukawa, K. (2004) Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis sp.* TOA-1. *Enzyme and Microbial Technology* 34:482- 489

*Optimización de los cultivos líquidos*

- Mizusawa, K., Ichishima, E., and Yoshida, F. (1966) Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. Part II. Identification of the organism and some conditions of protease formation. *Agricultural and Biological Chemistry* 30:35- 41
- Moallaei, H., Zaini, F., Larcher, G., Beucher, B., and Bouchara, J.P. (2006) Partial purification and characterization of a 37 KDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia* 161:369- 375
- Muga, A., Arrondo, J.L., Bellon, T., Sancho, J., and Bernabeu, C. (1993) Structural and functional studies on the interaction of sodium dodecyl sulfate with  $\beta$ -Galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300:451- 457
- Myers RH, Montgomery DC, and Anderson-Cook CM (2009) *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley-Interscience, New York
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., and Al-Zarban, S. (1998) A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol* 66:1- 11
- Patil, C.S., Gangawane, A.K., and Hatti, S.S. (2010) Production and characterization of alkaline thermostable protease from newly isolated *Bacillus* sp. *Journal of Plant Genomics* 1:09- 17
- Pissuwan, D. & Swaminathan, K. (2001) Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat Sci)* 35:171- 178
- Plackett, R.L. & Burman, J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33:305- 325
- Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., and Sreeramulu, K. (2010) Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:625- 633
- Puri, S., Beg, Q.K., and Gupta, R. (2002) Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Current Microbiology* 44:286- 290
- Ramnani, P. & Gupta, R. (2004) Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40:191- 196
- Riffel, A. & Brandelli, A. (2006) Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:395- 399
- Saber, W.I.A., El-Metwally, M.M., and El-Hersh, M.S. (2010) Keratinase production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. *Research Journal of Microbiology* 5:21- 35
- Sangali, S. & Brandelli, A. (2000) Feather keratin hydrolysis by *Vibrio* sp. strain kr2. *Journal of Applied Microbiology* 89:735- 743

*Optimización de los cultivos líquidos*

- Sareen, R. & Mishra, P. (2008) Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:399- 405
- Siezen, R.J. & Leunissen, J.A. (1997) Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* 6:501- 523
- Silveira, S.T., Casarin, F., Gemelli, S., and Brandelli, A. (2010) Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162:548- 560
- Singh, C.J. (1997) Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia* 137:13- 16
- Syed, D.S., Lee, J., Li.W.L., Kim, C., and Agasar, D. (2009) Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology* 100:1868- 1871
- Tapia, D.M. & Simoes, M.L. (2008) Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African Journal of Biotechnology* 7:296- 300
- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., and Mangamoori, L. (2007) Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp7. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141:187- 201
- Thys, R.C.S., Guzzon, S.O., Cladera-Olivera, F., and Brandelli, A. (2006) Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry* 41:67- 73
- Vignardet, C., Guillaume, Y.C., Michel, L., Friedrich, J., and Millet, J. (2001) Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *International Journal of Pharmaceutics* 224:115- 122
- Wang, J.J. & Shih, J.C.H. (1999) Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22:608- 616
- Wawrzkiwicz, K., Lobarzewski, J., and Wolski, T. (1987) Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 25:261- 268
- Wenster-Botz, D. (2000) Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90:473- 483
- Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y., and Qian, S. (2009) Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource Technology* 101:344- 350

# Capítulo 5

*Purificación y caracterización de una queratinaasa  
de *Purpureocillium lilacinum* LPSC#876*





**Resumen**

De un tiempo a esta parte, las enzimas queratinolíticas han ido ganando importancia debido a su posible utilización en la industria de los detergentes y en la industria cosmética y farmacéutica. La purificación y caracterización de estas enzimas es un paso fundamental y necesario, no sólo para profundizar el conocimiento de su mecanismo de acción sino también a la hora de evaluar su potencial aplicación en la industria. Al momento de plantear una posible aplicación industrial es necesario no sólo manejar de antemano conocimientos sobre la producción, sino también la estrategia de purificación y las características más relevantes de la enzima pura. En capítulos anteriores se demostró que *Purpureocillium lilacinum* produce dos proteasas extracelulares en cultivos sumergidos con residuo pelo como sustrato. De estas dos proteasas, una presentó actividad queratinolítica y fue purificada por técnicas cromatográficas convencionales. Si bien la presencia del pigmento melanina en el medio de cultivo -producto de la degradación del residuo pelo- dificultó el proceso de purificación, se logró obtener una fracción electroforéticamente homogénea de un peso molecular de 37 kDa. La inhibición de la actividad enzimática por PMSF y por  $Hg^{+2}$  indica la pertenencia de esta enzima al grupo de las serin- proteasas, particularmente a las subtilisinas tiol-dependientes. Las características más sobresalientes de esta enzima son: su apreciable estabilidad en un amplio rango de pH (4.0-9.0) y temperatura (hasta 65 °C); su estabilidad frente a solventes orgánicos, surfactantes y agentes oxidantes; así como su capacidad de hidrolizar sustratos como azul de queratina, azo-colágeno, rojo de elastina, azul de polvo piel y azo-albúmina. Estas propiedades la convierten en potencial candidata para ser usada en el área de la medicina y la cosmética para el tratamiento de pieles queratinizadas (cicatrices y queloides), asociada a la liberación controlada de fármacos y en la industria de los detergentes.

## **Introducción**

La purificación de las enzimas es una importante herramienta no sólo para el conocimiento del mecanismo de acción de las mismas sino también para su potencial aplicación a nivel industrial. La estrategia exacta de purificación de una enzima cualquiera depende de ciertos factores como son el material de partida y la localización de la enzima a purificar (extra/intracelular), el nivel de expresión de la misma, sus características bioquímicas y el propósito que se le dará a la misma (Gupta et al., 2002).

En general, un esquema de purificación de enzimas consiste en varios pasos u operaciones unitarias que pueden basarse en diferentes propiedades físicas, químicas o bioquímicas de los componentes que se desean separar: los primeros pasos tienen como objetivo clarificar la muestra (es decir, eliminar la mayor cantidad de impurezas presentes en el medio de cultivo) y concentrar el producto de interés, logrando bajos niveles de pureza pero perdiendo la menor cantidad de proteína posible (elevado rendimiento). Los pasos subsiguientes consisten en la aplicación de técnicas específicas de mayor resolución, que permitan obtener la enzima de interés con el grado de pureza deseada a expensas, en la mayoría de los casos, del rendimiento total del proceso. Entre los primeros pasos de clarificación y concentración en dicho esquema, las técnicas más empleadas son la filtración, centrifugación y precipitación con solventes, polímeros o sales, mientras que los subsiguientes pasos de purificación emplean técnicas más selectivas tales como las cromatográficas (Walsh, 2004).

Como se mencionó anteriormente los primeros pasos en el esquema de purificación involucran pasos de clarificación y concentración. La complejidad de estos pasos depende generalmente de si la enzima de interés es secretada al medio o no. La mayoría de las queratinasas son extracelulares y, al ser liberadas al medio de cultivo se separan de la biomasa por centrifugación y en algunos casos por filtración (Gupta & Ramnani, 2006). En los escasos reportes de queratinasas intracelulares o unidas a membrana, este primer paso involucra técnicas de recolección y ruptura celular (centrifugación seguida de sonicación) (Yu et al., 1971; Wawrzkievicz et al., 1987; Friedrich & Antranikian, 1996; Nam et al., 2002).

## *Purificación y caracterización*

Dado que generalmente las enzimas son secretadas al medio de cultivos, es muy común que se encuentren en muy baja concentración (altamente diluidas) y se presenta la necesidad de remover el agua en exceso, concentrando la enzima y haciendo que el volumen en los siguientes pasos de purificación sean más manejables. Este paso de concentración puede ser llevado a cabo por evaporación a presión reducida (rotavapor), por ultrafiltración o por diafiltrado (Walsh, 2004). Este primer paso de concentración - que implica la remoción del agua en exceso- suele ser acompañado por otro paso también de concentración que es la precipitación. En esta etapa la proteína de interés es precipitada por sales neutras, solventes orgánicos o polímeros de alto peso molecular. Los solventes orgánicos (acetona o etanol) y las sales neutras (sulfato de amonio) actúan disminuyendo la solubilidad de la proteína de interés en tanto que los polímeros de alto peso (generalmente polielectrolitos) actúan formando complejos insolubles con las proteínas. A pesar de la disponibilidad de técnicas rápidas y fáciles como la ultrafiltración para esta etapa de concentración, la revisión bibliográfica acerca de las estrategias adoptadas para la purificación de proteasas en general y queratinasas en particular en la última década demuestra que el sulfato de amonio sigue siendo el agente más elegido a la hora de concentrar las enzimas por precipitación (Chitte et al., 1999; Moallaei et al., 2006; Kotlova et al., 2007; Prakash et al., 2010; El-Ayouty et al., 2012).

Finalizados los pasos de clarificación y concentración, para purificar aún más la enzima se suelen aplicar una combinación de una o más técnicas cromatográficas entre las que se encuentran la cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular. Dependiendo de la complejidad que presente el medio al llegar a esta etapa, es la cantidad de pasos cromatográficos que se van a necesitar. Así, por ejemplo para la purificación de una queratinasa de cultivos de plumas de *Kocuria rosea* sólo se necesitó un paso de purificación (Bernal et al., 2006) al igual que en el caso de Syed et al. (2009) quienes luego de la precipitación con sulfato de amonio lograron purificar una queratinasa de un cultivo de plumas de *Streptomyces gulbargensis*. Sin embargo, autores como Kotlova et al. (2007); Cai et al. (2008) y Prakash et al. (2010) han necesitado 3 o más pasos de purificación, donde generalmente se incluyen uno o más pasos cromatográficos.

## *Purificación y caracterización*

Una vez purificadas, las enzimas son caracterizadas bioquímicamente mediante una serie de estudios que incluyen la determinación del pH y temperatura óptima, el peso molecular, estudios de inhibición, efecto de metales en la actividad enzimática, etc. Estas características propias de cada enzima ayudan a identificar el posible campo de aplicación de la misma.

En el caso de las queratinasas, la mayoría de ellas son proteasas alcalinas o neutras, con un pH óptimo en el rango de 7.5-9.0, aunque las hay con pHs óptimos más ácidos o alcalinos (Mitsuiki et al., 2004; Balaji et al., 2008). La temperatura óptima se encuentra en el rango de 30 °C a 80 °C, dependiendo del origen del microorganismo del cual fue purificada. Por ejemplo, la queratinasa producida por *Fervidobacterium pennavorans* presenta una temperatura óptima de 80 °C y la *F. islandicum* AW-1 de 100 °C (Friedrich & Antranikian, 1996; Nam et al., 2002). En cuanto a la estabilidad al pH y la temperatura, la literatura indica que por lo general estas enzimas son activas y estables en un amplio rango de pH (5.0-9.0) y temperatura, reportándose estabilidades tan altas como 6 h a 80 °C para la queratinasa de *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Riessen & Antranikian, 2001).

La mayoría de las queratinasas poseen un peso molecular menor que 50 kDa, pero se han reportado casos donde el peso molecular resulto ser mucho menor (18 kDa, Bressollier et al., 1999) o mucho mayor (240 kDa, Bernal et al., 2006).

Son en su mayoría serin o metalo – proteasas, mostrando una tendencia general a ser estimuladas en presencia de metales divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  e inhibidas por metales pesados y de transición como  $\text{Cu}^{+2}$  o  $\text{Ag}^{+}$  (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003; Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010). En cuanto al efecto que producen los solventes orgánicos, los detergentes y los agentes reductores, los resultados en la literatura son muy variados, encontrándose, por ejemplo, queratinasas estables en presencia de SDS y Triton X-100 (Riffel et al., 2003; Mitsuiki et al., 2004) como aquellas que no lo son (Böckle et al., 1995). En la Tabla 1 se resumen las características bioquímicas de algunas queratinasas reportadas a lo largo de la última década.

*Purificación y caracterización*

Tabla 1. Algunos microorganismos productores de queratinasas junto con sus propiedades bioquímicas más destacadas

Microorganismo	Tipo catalítico	Peso molecular (kDa)	pH óptimo	Temp. óptima (°C)	Referencia
<i>Bacillus</i> sp. SCB-3	Metalo-proteasa	134	7.0	40	Lee et al. (2002)
<i>Bacillus cereus</i> DCUW	Serin-proteasa	80	8.5	50	Ghosh et al. (2008)
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD1	Serin-proteasa	33	7.5	50	Lin et al. (1992)
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metalo-proteasa	64	8.5	50	Riffel et al. (2007)
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Serin-proteasa	> 200	9.0	100	Nam et al. (2002)
<i>Kocuria rosea</i>	Serin-proteasa	240	10.0	40	Bernal et al. (2006)
<i>Streptomyces pactum</i>	Serin-proteasa	30	7.0-10.0	40-75	Böckle et al. (1995)
<i>Meiothermus</i> sp. I40	Serin-proteasa	76	8.0	70	Kuo et al. (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Metalo-proteasa	60	8.0	50	Farag & Hassan (2004)
<i>Doratomyces microsporum</i>	Serin-proteasa	30-33	8.0-9.0	50	Gradišar et al. (2005)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Serin-proteasa	33	8.0	60-65	Gradišar et al. (2005)
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Serin-proteasa	22	8.3	37	Moreira-Gasparin et al. (2009)

## *Purificación y caracterización*

Dado que el costo de la obtención de las enzimas puede representar entre un 10 % hasta un 80 % del costo total del proceso biotecnológico, de acuerdo a la pureza requerida de la misma, es necesario identificar las características sobresalientes de la enzima en cuestión a fin de determinar si presenta el potencial para ser aplicada en la industria y, de serlo, a qué tipo de industria puede ser enfocado su uso.

En este capítulo se presenta la purificación y caracterización de una queratinasa de *P. lilacinum* LPSC # 876 y se discute su potencial campo de aplicación.

## **Materiales y métodos**

### ***Condiciones de cultivo y procesamiento de la muestra previa purificación de la enzima***

Como punto de partida para la purificación de la queratinasa *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 se realizaron cultivos en medio líquido, empleando erlenmeyers de 1000-ml conteniendo 200-ml del medio mineral descrito en el capítulo 2. Los erlenmeyers con medio mineral base conteniendo residuo pelo fueron esterilizados en autoclave por 15 min a 121 °C y luego inoculados con una suspensión de conidios de *P. lilacinum* obteniendo una concentración final de los mismos de  $2 \times 10^6$  conidios/ml. Los cultivos se incubaron a 28 °C por un término de 117 h a 200 rpm en shaker de agitación orbital (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Una vez finalizados los cultivos, se unificó el contenido de los mismos y se procedió a separar la biomasa y demás restos de cultivo del sobrenadante por centrifugación ( $5000 \times g$ , 20 min, 4 °C).

### ***Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas***

Luego de cada paso de purificación, las muestras fueron analizadas en términos de actividad proteolítica y queratinolítica siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 2. En los experimentos concernientes a la caracterización de la enzima purificada se utilizó la actividad proteolítica como medida indirecta de la actividad queratinolítica. El contenido de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

### ***Purificación de queratinasa de *P. lilacinum****

El sobrenadante de los cultivos se filtró primero por tela de muselina, se centrifugó y luego a través de membrana de acetato de celulosa (0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) para eliminar las partículas que pudieron quedar en solución luego del centrifugado y se concentró por evaporación a presión reducida utilizando un

### *Purificación y caracterización*

evaporador rotatorio a escala mesada (TECNAL TE-211). Al extracto enzimático concentrado y enfriado en baño de agua-hielo se le agregó, lentamente y bajo agitación, sulfato de amonio sólido (Anedra) hasta llegar a una saturación del 85 %. El precipitado obtenido se disolvió en 20 ml de Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0; BT) y luego se desaló mediante exclusión molecular por medio de una columna cromatográfica Sepharosa<sup>®</sup> G-25 (XK 16/60, General Electric Little Chalfont, UK) equilibrada con BT. La elución isocrática se llevó a cabo con 4 volúmenes de columna, utilizando un caudal de 1 ml/min, recolectando fracciones de 5 ml. Aquellas fracciones positivas a actividad queratinasa se juntaron, se concentraron por liofilización y se resuspendieron en 4 ml de BT. La muestra fue luego sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex<sup>®</sup>, XK 26/10, General Electric) pre-equilibrada en el mismo buffer. El lavado de la columna se realizó con BT y la elución fue llevada a cabo con un gradiente lineal de NaCl en BT (0.0-1.0 M) en 10 volúmenes de columna a un caudal de 2 ml/min. Se continuó con la purificación con aquellas fracciones (5 ml) que luego de ser eluidas de la columna DEAE-Sephadex<sup>®</sup> presentaron actividad queratinasa, las cuales se juntaron y se sometieron a un nuevo paso de cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna Sp-Sepharosa-FF<sup>®</sup> (HiLoad 16/10, General Electric) preequilibrada en BT. Nuevamente, el lavado de la columna se realizó con BT y la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de NaCl en el mismo buffer (0.0-1.0 M) en 10 volúmenes de columna a un caudal de 2 ml/min. Finalmente, las fracciones que presentaron actividad queratinasa se juntaron, se concentraron por liofilización y se desalaron isocráticamente en una columna de exclusión molecular (Superdex-75, XK 16/60, General Electric) equilibrada con BT + 0.15 M de NaCl en 2 volúmenes de columna, a un caudal de 0.75 ml/min. La enzima purificada fue conservada a -20 °C hasta ser utilizada para la caracterización bioquímica de la misma.

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo en un equipo de FPLC (AKTA FPLC\_U900 Chromatographyc System, General Electric, GE Healthcare).



## *Purificación y caracterización*

A modo de resumen, a continuación se presenta un esquema general del proceso de purificación

### ***Cultivo filtrado por tela de muselina, centrifugado y filtrado de acetato de celulosa (0,45µm)***

1040 ml



### ***Evaporación a presión reducida***

30 °C

Volumen final concentrado 290 ml



### ***Precipitación con Sulfato de amonio***

85% de saturación

Volumen final: 20 ml



### ***Sepharosa®-G25 (XK 16/60)***

Buffer de equilibrio: Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Elución: Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Caudal: 1 ml/min; Volumen de fracción: 5 ml

Volumen final: 120ml



### ***DEAE-Sephadex® (XK 26/10)***

Buffer de equilibrio: Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Elución: Gradiente de NaCl 1M en Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Caudal: 2 ml/min; Volumen de fracción: 5 ml

Volumen final: 26.5 ml



### ***Sp-Sepharosa-FF® (HiLoad 16/10)***

Buffer de equilibrio: Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Elución: Gradiente de NaCl 1M en Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0)

Caudal: 2 ml/min; Volumen de fracción: 5 ml

Volumen final: 26.5 ml



### ***Superdex®-75 (XK 16/60)***

Buffer de equilibrio: Buffer Tris-HCl 20mM pH 7.0

Elución: Buffer Tris-HCl (20 mM) NaCl 0,15M pH: 7.0

Caudal: 0.75 ml/min; Volumen de fracción: 5 ml

Volumen final: 13.5 ml

***Determinación del peso molecular de la queratinasa de *P. lilacinum* y de su actividad queratinasa mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma***

La determinación de la pureza de la muestra, del peso molecular de la enzima y su actividad queratinolítica se llevaron a cabo realizando un SDS-PAGE y su respectivo zimograma. La muestra desalada se corrió por triplicado en condiciones desnaturalizantes utilizando un gel de acrilamida al 10 % de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970) en un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad) utilizando un kit de marcadores de peso molecular de amplio rango (30-200 kDa, SD S6H2, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). En cada SDS-PAGE se sembraron muestras hervidas y no hervidas. En la parte del gel destinada a zimograma sólo se sembró una alícuota de la muestra no hervida, en tanto que en la parte correspondiente al SDS-PAGE normal se sembraron una hervida y una no hervida. Es importante aclarar que el buffer de siembra contenía  $\beta$ -mercaptoetanol en todos los casos. Luego de finalizada la corrida electroforética, una parte del gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 y en tanto que otra parte fue destinada a la realización del zimograma. La parte destinada a zimograma se sumergió en Buffer Tris-HCl (100 mM, PH 9.0) conteniendo 2.5 % de Tritón X-100 durante 60 minutos, con agitación constante en un agitador orbital (New Brunswick Scientific) a 50 rpm y 28 °C con el fin de eliminar el SDS y así permitir el correcto plegado de la enzima (García-Carreño et al., 1993). El detergente Tritón X-100 se retiró luego lavando el gel tres veces con Buffer Tris-HCl (100 mM, PH 9.0) y se incubó con una solución al 1% (p/v) de queratina soluble en el mismo buffer a 28 °C durante 90 min. La queratina soluble se obtuvo de acuerdo al protocolo diseñado por Wawrzkievicz et al. (1987). Finalmente, el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 para el análisis de la zimografía. El desarrollo de las zonas claras sobre el fondo azul indica la presencia de actividad queratinasa. Los marcadores de masa molecular utilizados fueron: Miosina porcina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

**Caracterización bioquímica de la enzima pura****1.- Efecto del pH sobre la estabilidad y la actividad enzimática**

La estabilidad de la enzima pura al pH se estudió en un rango de pHs de 3.0 a 13.0, en tanto que el pH óptimo de la actividad proteolítica de la enzima se determinó en un rango de pH menor (6.0 a 13.0) debido a la poca solubilidad que presenta el sustrato azocaseína a pH menores a 6.0. En ambas experiencias se utilizó una mezcla de buffers (Glicina, MES y Tris-HCl) de composición 20 mM cada uno, a fin de eliminar cualquier tipo de interferencia que pudiera generarse por la naturaleza de cada uno de los buffers.

Para la medida de la estabilidad al pH, la enzima pura se incubó a cada pH durante 1 h a 37 °C y luego se determinó la actividad proteolítica residual en las condiciones estándar de medida que se detallaron en el capítulo 2.

El pH óptimo de la enzima se determinó disolviendo el sustrato azocaseína en la mezcla de buffers a los distintos pHs de medida siguiendo el protocolo de medida descrito en el capítulo 2.

**2.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima**

La estabilidad térmica se estudió de la misma forma que para el extracto crudo (efecto del agregado de polioles) pero ampliando un poco el rango de temperatura (40 °C a 65 °C durante 180 minutos).

**3.- Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la estabilidad de la enzima**

Se siguió el mismo protocolo que para el extracto crudo.

**4.- Efecto de los iones metálicos sobre la actividad enzimática**

El efecto de diferentes iones metálicos ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ , 1mM) sobre la estabilidad de la queratinasa purificada se estudió siguiendo el mismo protocolo que para el extracto crudo.

**5.- Efecto de solventes orgánicos, surfactantes y agentes oxidantes sobre la estabilidad de la enzima**

La estabilidad de la enzima frente a diferentes solventes orgánicos (dimetil sulfóxido, DMSO; Metanol; Etanol y Alcohol isopropílico, 1 % v/v), agentes tensioactivos (Triton X-100; Tween 20; Tween 85, 1 % v/v y SDS, 0.5 % p/v) y agentes

## *Purificación y caracterización*

oxidantes ( $H_2O_2$  y perborato de sodio, 1 % p/v) se estudió pre-incubando la enzima en presencia de cada uno de estos agentes químicos durante 1 h a temperatura ambiente y determinando la actividad proteolítica residual frente a un 100 % que correspondía a la enzima pura incubada el mismo tiempo y misma temperatura sin el agregado de compuesto químico.

### *6.- Determinación de los parámetros cinéticos*

Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{máx}$  fueron determinados a partir de las medidas de velocidad inicial utilizando azocaseína como sustrato a 37 °C y pH 9.0. El rango de concentraciones utilizado fue de 0.125 – 10 mg/ml. El ajuste al modelo clásico de Michaelis-Menten se realizó mediante la transformación de Hanes-Hultin (1967).

### *7.- Hidrólisis de sustratos proteicos - especificidad de sustrato*

La capacidad de la enzima queratinasa de *P. lilacinum* de hidrolizar distintos sustratos proteicos se analizó utilizando un grupo de sustratos cromógenicos, algunos de ellos, derivados de componentes de la piel. Estos sustratos fueron divididos en sustratos insolubles: azul de queratina, azul de polvo piel (*hide poder azure*, HPA), azo-colágeno (*azocoll*), rojo de elastina (*elastin congo red*), azoqueratina y sustratos solubles: azoalbúmina y azocaseína.

Para el caso de sustratos insolubles, el protocolo de medida de actividad fue similar al detallado en el capítulo 2, salvo ciertas modificaciones que se detallan a continuación: La mezcla de reacción consistió en 5 miligramos de sustrato y 0.9 ml de Buffer Tris-HCl (100 mM, pH 9.0). La mezcla de reacción se agitó por 15 minutos en baño de agua- hielo, utilizando un agitador sumergible multipunto Thermo-Variomag® a fin de que el sustrato quede completamente suspendido. Transcurrido ese tiempo se adicionó en cada tubo 0.1 ml de la enzima convenientemente diluida. A tiempo cero, el sistema se transfirió a un baño termostático para la incubación a 37 °C y 100 rpm. El tiempo de incubación varió en cada caso de acuerdo al sustrato utilizado y a fin de realizar las medidas en condiciones de sustrato saturante. La reacción se detuvo colocando los tubos en baño de agua-hielo durante 30 min, seguido de centrifugación (15 minutos a 5000 g). Se midió la absorbancia a 595 nm para los dos primeros sustratos, 520 nm para azo-colágeno y 495 nm para rojo de elastina. Se definió una unidad arbitraria (U/ml) como la cantidad de la enzima que provoca un aumento de 0.01

## *Purificación y caracterización*

unidades a cada una de las condiciones de medida (nm), por minuto bajo las condiciones de medida estándar.

En el caso de azocaseína y azo-albúmina, el protocolo de medida que se utilizó es el que se detalló en el capítulo 2.

### *8.- Análisis de huellas peptídicas – identificación de la enzima*

El análisis de huellas peptídicas se realizó en el Institut Pasteur de Montevideo. Este análisis se realizó mediante una digestión trípica in situ de la enzima queratinasa presente en un SDS-PAGE durante 12 h a 37 °C. Los péptidos obtenidos de esta digestión se extrajeron del gel con una solución de acetonitrilo (60 % v/v) en ácido trifluoroacético (0.2 % p/v), se concentraron por liofilización y se desalaron por medio de una microcolumna C18 de fase reversa para ser inyectados directamente desde la columna a un espectrofotómetro de masa MALDI TOF/TOF (modelo 4800 Analizar, Applied Biosystems, Framingham, EE.UU). La proteína se identificó utilizando el programa MASCOT y la base de datos NCBIInr.

### *9.- Determinación de la secuencia N-terminal de la queratinasa de P. lilacinum*

La secuencia N-terminal de la enzima purificada se determinó utilizando un secuenciador de proteínas ABI 494 como servicio externo en Tufts University, Boston, MA, EE.UU.

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos en cada experiencia se analizaron mediante un análisis de varianza (*one way*-ANOVA) utilizando el test de Tukey HSD para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el programa Statgraphics PLUS<sup>®</sup>. Los resultados se presentan como la media de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

## **Resultados y discusión**

### ***Purificación de una queratinasa de *P. lilacinum* a partir de cultivos líquidos***

Como se demostró en el capítulo de producción y caracterización de enzimas de *P. lilacinum*, este hongo produce una única enzima extracelular con actividad queratinolítica durante su crecimiento en un medio mineral mínimo con residuo pelo como fuente de carbono y nitrógeno, razón por la cual se decidió diseñar una estrategia para su purificación. Se partió de cultivos líquidos de 117 h de incubación que fueron centrifugados y los sobrenadantes unificados para ser concentrados por evaporación a presión reducida. A partir del extracto crudo concentrado por rotavapor (72 U<sub>azoq</sub>/mg de proteína) se realizó una precipitación con sulfato de amonio (85 % de saturación) recuperándose toda la actividad queratinolítica en el precipitado sugiriendo que la enzima tiene una muy baja hidrofobicidad. La enzima concentrada fue luego desalinizada en una columna G-25 equilibrada con Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7.0, BT), con ambos pasos (precipitación y desalado) se pudo eliminar una pequeña fracción del color presente en el extracto crudo. Debido a que la presencia de pigmentos puede dificultar el proceso de purificación porque éstos son adsorbidos inespecíficamente a los rellenos cromatográficos compitiendo con la enzima en el pegado a los centros reactivos de la matriz de la columna, se realizó un primer intento de separarlos mediante una columna de exclusión molecular Sephacryl S-100. No se logró separar los pigmentos de las fracciones con actividad queratinolítica y se descartó este paso de purificación. La siguiente opción fue probar con una columna de intercambio iónico y se eligió la columna de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex) equilibrada con BT, observándose una adsorción de los pigmentos a la columna de intercambio y actividad queratinolítica en la fracción no retenida de la columna. El hecho de que la fracción no retenida de la columna DEAE-Sephadex fuera la que presentara actividad queratinolítica permitió inferir acerca de la carga que presentaba la enzima de interés en BT y decidir qué columna de intercambio iónico se utilizaría a continuación. Así, la fracción no retenida fue sometida a una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna Sp-Sepharosa-FF preequilibrada en BT, encontrándose actividad queratinolítica en un pico único a 0.15 – 0.25 M de NaCl. El último paso de purificación consistió en una

*Purificación y caracterización*

cromatografía de exclusión molecular Superdex-75 (Figura 1 C y D). Este paso de pulido permitió obtener una solución de la enzima queratinasa con una actividad específica de 1432 U azoq/mg (el doble de lo obtenido hasta el paso anterior). El rendimiento total de proceso fue de 1.3 %, con un aumento de la actividad específica de 19.8 veces y una banda electroforéticamente homogénea según el análisis por SDS-PAGE (Figura 1 B). En la Tabla 1 se presentan los pasos involucrados en esta estrategia de purificación.

Tabla 1. Etapas de purificación de una queratinasa de *P. lilacinum*

Etapas	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad Queratinasa Total (U <sub>azoq</sub> )	Actividad específica (U <sub>azoq</sub> /mg)	Rendimiento (%)
<i>Cultivo concentrado</i>	290	503.8	36274.9	72.0	100
<i>Precipitación por sulfato de amonio</i>	20	302.5	30982.8	102.4	85
<i>Exclusión molecular G-25</i>	120	37.2	3950.7	106	11
<i>DEAE Sepharosa</i>	26.5	4.14	2759.8	625.8	7.6
<i>Sp Sepharosa FF</i>	26.5	1.40	954.3	640	2.6
<i>Superdex 75</i>	13.25	0.32	458.5	1432.7	1.3

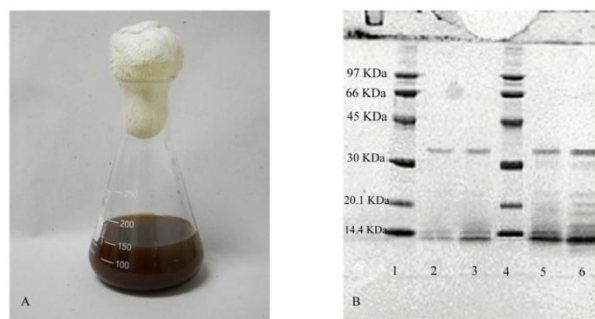


Figura 1. A) Extracto crudo concentrado por rotavapor. B) SDS-PAGE 12% de diferentes etapas de purificación. Calles 1 y 4 Patrón de bajo peso molecular; 2 y 3 fracciones de Superdex-75; 5 y 6 fracciones de Sp

*Purificación y caracterización*

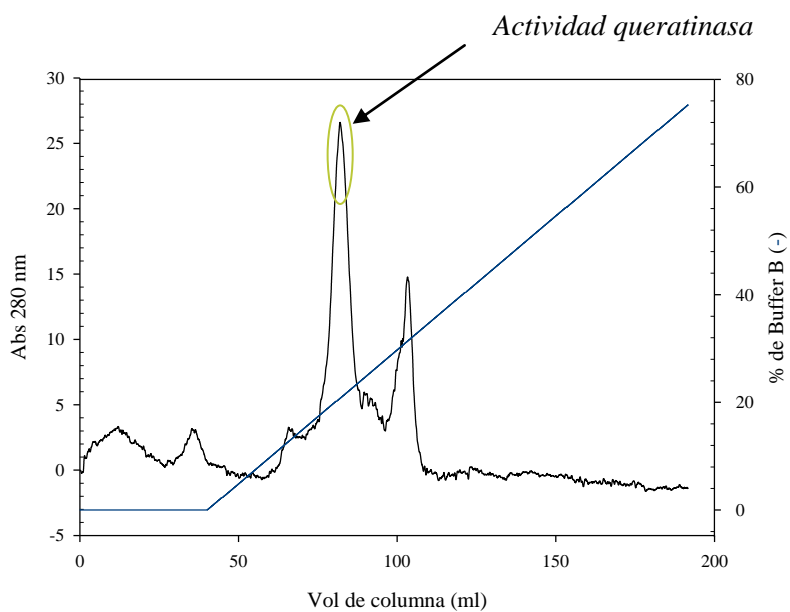


Figura 1. C) Cromatograma obtenido cuando la muestra se somete a cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna Sp-Sepharosa-FF

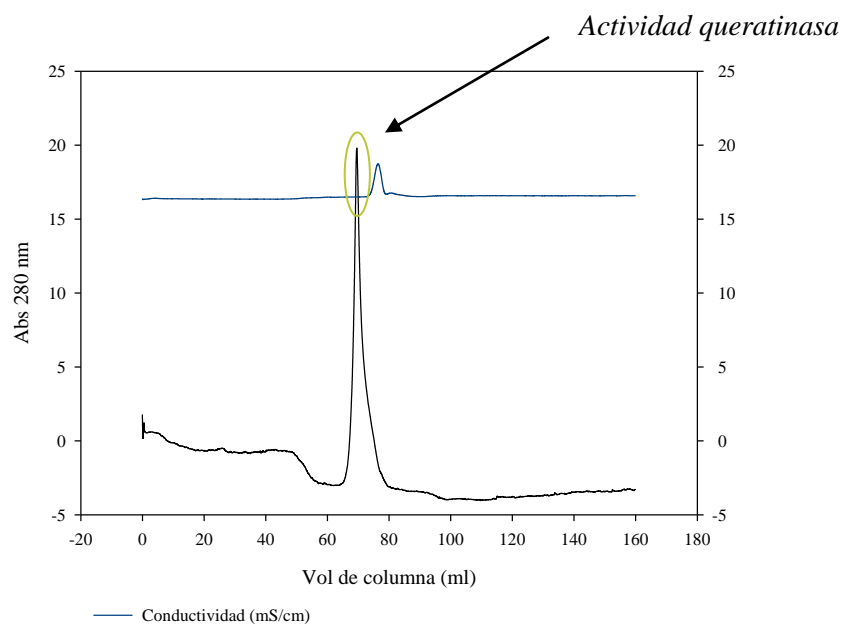


Figura 1. D) Cromatograma de la cromatografía de exclusión molecular Superdex-75



## *Purificación y caracterización*

### ***Determinación del peso molecular de la queratinasa de *P. lilacinum* y de su actividad queratinasa mediante SDS-PAGE acoplado a zimograma***

El peso molecular de la enzima pura, así como su actividad queratinolítica se determinaron por SDS-PAGE acoplado a zimograma utilizando queratina soluble como sustrato. El peso molecular resultó ser de 37 kDa (Figura 2), siendo similar a los pesos moleculares reportados para otras proteasas purificadas de otras cepas de *P. lilacinum*; por ejemplo Bonants et al. (1995) reportan una serin-proteasa de 33.5 kDa purificada a partir de cultivos de *Paecilomyces lilacinus* CBS 143.75; Kotlova et al. (2007) reporta una tiol-serin-proteasa de 33 kDa purificada a partir de cultivos de *P. lilacinus* (Thom) Samson VKM F-3891 y Khan et al. (2003) reporta una proteasa de 37 kDa purificada a partir de cultivos de *P. lilacinus* # 251. En línea con estos resultados, Gradišar et al. (2005) reporta una queratinasa de 33 kDa purificada de cultivos de *P. marquandii* MZKI B639. Es más, el peso molecular resultó estar dentro del rango general reportado para otras queratinasas (20-60kDa).

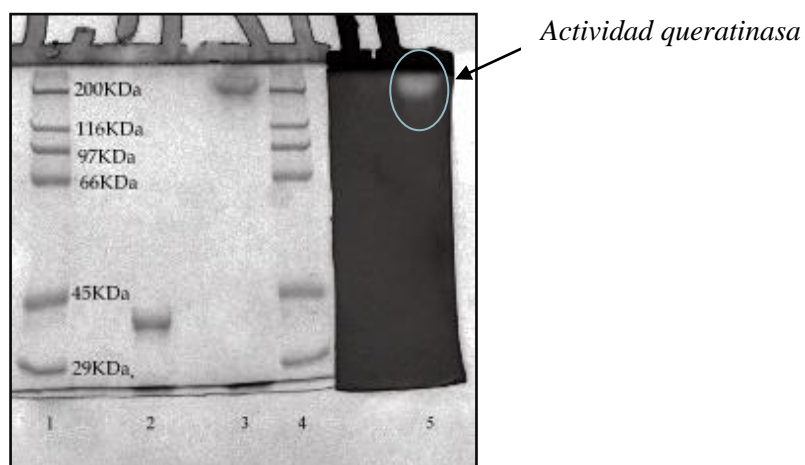


Figura 2. SDS-PAGE acoplado a zimograma con queratina soluble como sustrato. Calles 1 y 4 Marcador de peso molecular de amplio rango; 2 enzima pura hervida; 3 enzima pura sin hervir; 5 zimograma

Curiosamente, cuando la enzima pura sin hervir se sometió a SDS-PAGE y al correspondiente zimograma, dos hechos fueron muy llamativos: primero, que la actividad enzimática no se vio afectada en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol ni de SDS y

## *Purificación y caracterización*

segundo, que el peso molecular aparente resultó ser alto. El hecho de que la actividad enzimática no se viera afectada por este agente reductor permitió inferir que en el sitio activo de la queratinasa de *P. lilacinum* no se encuentran enlaces disulfuro y por otro lado, en presencia de SDS, la enzima adoptaría una conformación de alto peso molecular debido a interacciones intermoleculares con otras moléculas de proteína y con el solvente, estas interacciones serían eliminadas al momento de calentar la muestra. Un comportamiento similar fue reportado por Muga et al. (1993) en su estudio de la interacción del detergente SDS con la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

### ***Caracterización bioquímica de la enzima pura***

#### *1.- Efecto del pH sobre la estabilidad y la actividad enzimática*

La enzima resultó ser completamente estable en un rango de pH entre 4.0 y 9.0, por fuera de este rango, resultó ser moderadamente estable, reteniendo un 50 % y un 40 % de su actividad enzimática a pH 3.0 y 12.0, respectivamente (Figura 3 A). Muy pocas queratinasas han manifestado poseer estabilidad a pHs tan alcalinos como presentó la queratinasa de *P. lilacinum* LPSC # 876. Entre ellas se encuentran las queratinasas de microorganismos tales como *Kocuria rosea*, cuya estabilidad cae dentro de un rango de pH 10.0-11.0; de *Norcardiopsis* sp. TOA-1, a un pH de 12,0 y de *Bacillus* sp. AH-101, entre pH 11.0 y 12.0 (Takami et al., 1989; Mitsuiki et al., 2004; Bernal et al., 2006). La mayoría de las queratinasas poseen una estabilidad relativamente buena dentro de un rango de pHs entre 7.0-9.0 como por ejemplo, la queratinasa de *Streptomyces gulbargensis* que posee su máxima estabilidad dentro de este rango (Syed et al., 2009), o la queratinasa de *Myrothecium verrucaria* (Moreira-Gasparin et al., 2009) cuya máxima estabilidad se encuentra en un rango de entre 5.0 y 9.0. En cambio, hay queratinasas cuyo rango de estabilidad al pH es aún mucho menor como sucede en el caso de la queratinasa de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* (Muhsin & Hadi, 2001), la cual presenta 100 % de actividad residual a pH 5.5 con una caída a 75 % cuando el pH es de 5.0 o de 6.0.

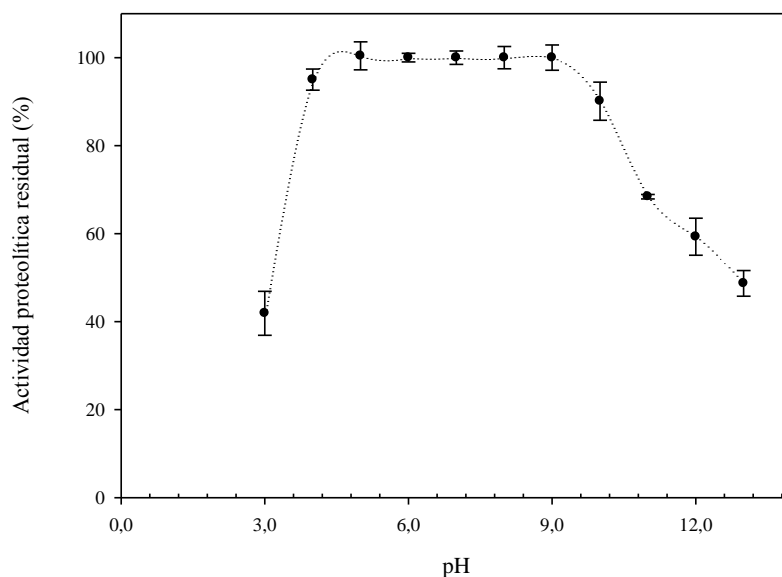


Figura 3. A) Efecto del pH en la estabilidad de la enzima pura

El efecto de pH sobre la actividad proteolítica de la enzima se determinó incubando la misma en presencia de azocaseína (1 % p/v) a distintos pH comprendidos en un rango entre 6.0 y 13.0 durante 30 min a 37 °C. Se observó que la enzima pura es activa en todo el rango de pH estudiado, con un máximo de actividad en el rango de pH de entre 7.0 y 12.0. En otras palabras, la queratinasa de *P. lilacinum* presenta un rango de pH óptimo comprendido entre estos valores, a pH 6.0 y a pH 13.0 conservó un 66 % y un 91 % de su actividad, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 3 B). Si se compara este valor de pH óptimo frente a los 3 reportes de proteasas purificadas a partir de especies de *P. lilacinus*, se puede observar que la queratinasa purificada en esta tesis resulta ser la de mayor rango de pH óptimo. La proteasa purificada a partir de cultivos de *P. lilacinus* (Thom) Samson VKM F-3891 presentó un pH óptimo de 10-11.5 (Kotlova et al., 2007), en tanto que para la proteasas reportadas por Bonants et al. (1995) y Khan et al. (2003) el pH óptimo resultó ser de 10.3 y 10.2, respectivamente. Es más, esta última proteasa a pH 12.6 sólo presenta un 0.63 % de actividad residual.

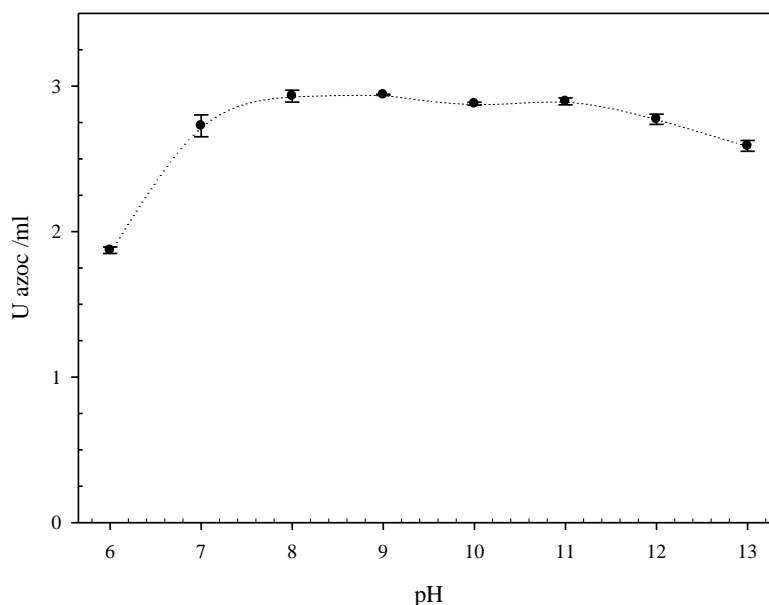


Figura 3. B) pH óptimo para la queratinasa de *P. lilacinum*

Haciendo una comparación un poco más general con otras queratinasas, se puede observar que son muy pocas las queratinasas que presentan pH óptimo en la región alcalina. Con un pH óptimo de 10.0 se reportan las queratinasas purificadas de cultivos de *Fervidobacterium pennavorans* y de *K. rosea* (Friedrich & Antranikian, 1996; Bernal et al., 2006) y, con un pH óptimo de 11.0, dos queratinasas purificadas a partir de cultivos de *B. halodurans* PPKS-2 (Prakash et al., 2010) y *Streptomyces* sp. S7 (Tatineni et al., 2008), respectivamente. Por lo general la mayoría de las queratinasas reportadas presentan un pH óptimo ligeramente alcalino, por ejemplo, las queratinasas de *P. marquandii* y *Doratomyces microsporus* presentan ambas pH óptimo cercano a 8.0 (Gradišar et al., 2005), la queratinasa de *Microbacterium* sp. un pH óptimo de 7.5 (Thys & Brandelli, 2006) y, la de *B. cereus* DCUW de 8.5 (Ghosh et al., 2008).

## 2.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima

La estabilidad térmica de la queratinasa de *P. lilacinum* fue estudiada en un rango de temperaturas de entre 40 °C y 65 °C con un tiempo máximo de incubación de 180 minutos. Tal como se observa en la Figura 4, la queratinasa retuvo cerca del 90 % de la actividad luego de 3 h de incubación a 40 °C y más de un 40 % de actividad a 50 °C. A 65 °C la enzima retiene sólo un 23 % de su actividad luego de 30 minutos de

*Purificación y caracterización*

incubación, observándose pérdida total e irreversible de la actividad luego de 120 minutos. La vida media de la enzima se estimó en 137 y 68 min a 50 y 55 °C, respectivamente, cayendo a 23 min cuando la temperatura es 60 °C (suponiendo una cinética de inactivación térmica de primer orden).

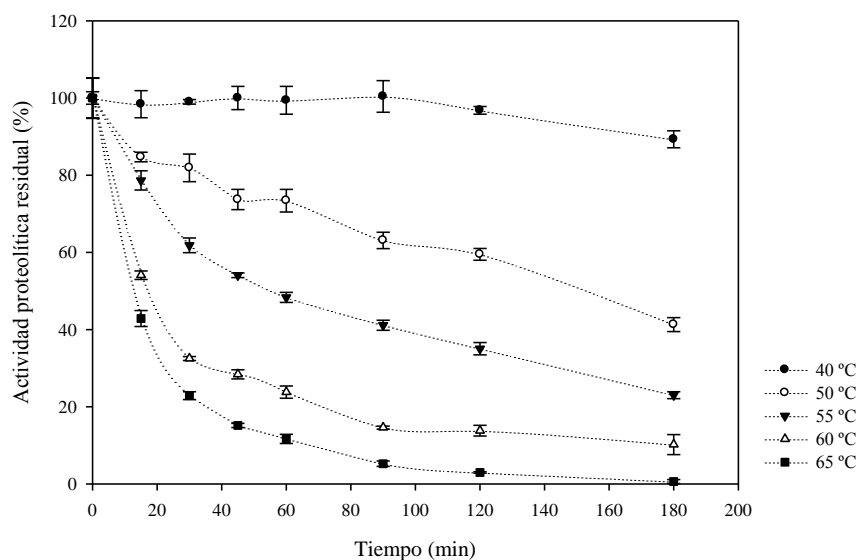


Figura 4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de queratinasa de *P. lilacinum* en términos de actividad residual vs tiempo de incubación (min) a distintas temperaturas

Se han reportado diferentes resultados para el estudio de la estabilidad térmica de distintas queratinasas, encontrándose queratinasas que presentan una gran estabilidad a temperaturas extremas (90 °C - 100 °C) (Friedrich & Antranikian, 1996; Nam et al., 2002; Bernal et al., 2006), queratinasas que presentan moderada estabilidad como la purificada en esta tesis (Gradišar et al., 2005; Thys & Brandelli, 2006; Syed et al., 2009) y queratinasas que presentan una estabilidad más baja, como por ejemplo, la queratinasa purificada de cultivos de *M. verrucaria* que sólo presenta estabilidad hasta los 45 °C (Moreira-Gasparin et al., 2009) o la queratinasa de *Bacillus* sp. P7 que presenta una vida media de 53 min a 50 °C y menos de 10 min a 55 °C (Correa et al., 2010).

## *Purificación y caracterización*

### *3.- Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la estabilidad de la enzima*

La mayoría de las queratinasas reportadas en la literatura pertenecen al grupo de las serin-proteasas y otro porcentaje menor a las metalo-proteasas. Con el objetivo de clasificar a la queratinasa de *P. lilacinum* dentro de alguno de los 4 grupos de proteasas existentes (serin-proteasas, metalo-proteasas, cistein-proteasas o aspartil-proteasa), se estudió el efecto de los inhibidores de proteasas. La enzima se incubó 1 h a temperatura ambiente (20 °C) y luego se determinó la actividad proteolítica residual, tomando como 100 % la actividad proteolítica de la enzima en ausencia de inhibidores. El perfil de inhibición obtenido se presenta en la Tabla 1, en la cual se puede observar que el PMSF inhibió de manera casi completa a la enzima (98.2 % de inhibición), en tanto que, en presencia de los demás inhibidores, la actividad enzimática se vio escasamente afectada. Este perfil de inhibición indica que la queratinasa purificada a partir de cultivos de *P. lilacinum* LPSC # 876 pertenece al grupo de las serin-proteasas, coincidiendo con el perfil de inhibición de las demás proteasas reportadas para el género *Paecilomyces* o *Purpureocillium* (citados anteriormente).

### *4.- Efecto de los iones metálicos sobre la actividad enzimática*

En la Tabla 1 se indica el efecto en la actividad de la queratinasa de ciertos iones metálicos ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ , 1 mM). Ninguno de los iones metálicos estudiados tuvo efecto positivo en la actividad, más bien, todos inhibieron en mayor o menor medida la actividad enzimática, observándose el mayor efecto inhibitorio para el caso del ion mercurio. La inhibición por  $Hg^{+2}$  (92.1 % de inhibición) sugiere que la enzima presenta en la cercanía de su sitio activo grupos  $-SH$  libres. Basados en la presencia de estos grupos funcionales en la cercanía del sitio activo de varias serin-proteasas es que autores como Kotlova et al. (2007) sugieren que, para el caso particular de una serin-proteasa purificada a partir de una cepa de *P. lilacinus* (la cual es inhibida por compuestos mercuriales) puede ser clasificadas como perteneciente a una subfamilia dentro de la familia S8 de *subtilisin-like* proteasas: las subtilisinas tiol-dependientes.

*Purificación y caracterización*

Tabla 1. Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad proteolítica de la queratinasa

Compuesto químico	Concentración	Actividad proteolítica residual (%)
Control		100
<i>Inhibidores de proteasas</i>		
PMSF	1 mM	1.8 ± 0.5
Iodoacetato	10 mM	79.4 ± 0.6
EDTA	5 mM	93.0 ± 1.8
1,10-Fenantrolina	1 mM	88.3 ± 1.0
Pepstatina A	100 µg/ml	88.7 ± 2.3
<i>Iones metálicos</i>		
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	72.7 ± 1.2
Zn <sup>2+</sup>	1 mM	74.9 ± 1.4
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	81.7 ± 0.5
Hg <sup>2+</sup>	1 mM	7.9 ± 0.6
K <sup>+</sup>	1 mM	83.5 ± 1.0
<i>Detergentes</i>		
Tritón X-100	1.0 % (v/v)	100 ± 0.4
Tween 20	1.0 % (v/v)	98.3 ± 1.9
Tween 85	1.0 % (v/v)	101.5 ± 2.6
SDS	0.5 % (v/v)	69.5 ± 2.5
<i>Agentes oxidantes</i>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 % (w/v)	99.4 ± 5.5
Perborato de sodio	1 % (w/v)	99.7 ± 2.4
<i>Solventes orgánicos</i>		
DMSO	1 % (v/v)	99.0 ± 0.6
Etanol	1 % (v/v)	100 ± 5.8
Metanol	1 % (v/v)	100 ± 5.1
Isopropanol	1 % (v/v)	88.7 ± 5.5

## *Purificación y caracterización*

Dado que la queratinasa de *P. lilacimun* purificada en esta tesis resultó ser inhibida por PMSF y por el  $\text{Hg}^{+2}$ , tal cual ocurre con la reportada por Kotlova et al. (2007) es que se sugiere que se está en presencia en este caso también, de una queratinasa que es una serin-proteasa (por su mecanismo de acción) tiol-dependiente (por la presencia de grupos  $-\text{SH}$  cerca del sitio activo). Por otro lado, resulta importante destacar que esta queratinasa difiere de la serin-proteasa reportada por Bonants et al. (1995) que no es inhibida por compuestos mercuriales.

La queratinasas en general poseen comportamientos disímiles cuando son incubadas con iones metálicos, por ejemplo autores como Cai et al. (2008) o Thys & Brandelli (2006), entre otros, reportan este descenso en la actividad para queratinasas purificadas de *B. subtilis* y *Microbacterium* sp, respectivamente. En tanto que, Balaji et al. (2008) reportan que  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Ni}^{+2}$  (5 mM) aumentan la actividad enzimática (mientras que  $\text{Hg}^{+2}$  la suprime) para una queratinasa purificada de cultivos de *B. subtilis* MTCC (9102).

### *5.- Efecto de solventes orgánicos, surfactantes y agentes oxidantes sobre la estabilidad de la enzima*

Dentro del conjunto de solventes orgánicos estudiados, sólo en presencia de isopropanol la enzima perdió un 11.3 % de actividad luego de 1 h de incubación ( $p < 0.05$ ), y resultó ser completamente estable en presencia de los demás solventes, coincidiendo con los resultados reportados para queratinasas de *K. rosea* (Bernal et al., 2006), *Bacillus* sp. P7 (Correa et al., 2010) y *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (Mitsuiki et al., 2004). En presencia de surfactantes, la queratinasa demostró ser 100 % estable cuando se incubó en presencia de Triton X-100, Tween 20 y Tween 85 al 1 % v/v cada uno, pero en presencia de SDS (0.5 % p/v) la enzima perdió cerca de un 30 % de su actividad. El SDS es reconocido por ser un fuerte agente desnaturizante de proteínas, incluyendo a las proteasas alcalinas. El mecanismo por el cual este detergente desestabiliza a las proteínas es por medio de la interacción entre las cabezas polares del detergente y los aminoácidos cargados de las cadenas laterales que presentan las proteínas y entre las cadenas del SDS y los aminoácidos no polares de la superficie y del interior (Otzen, 2002). Sin embargo, la actividad residual que presenta la queratinasa purificada en esta tesis resultó ser superior a la reportada para la queratinasa de *F.*



## *Purificación y caracterización*

*islandicum* (51 % de inactivación) o de *B. subtilis* P13 (83 % de inactivación) (Nam et al., 2002; Pillai & Archana, 2008) en presencia de este detergente. En cuanto a la estabilidad frente a agentes oxidantes, ésta demostró ser totalmente estable ( $p > 0.05$ ), cosa que no sucede cuando estos agentes fueron probados sobre proteasas de *B. licheniformes* RP1, las cuales retienen sólo el 48 % de actividad (Sellami-Kamoun et al., 2008) o de *Aspergillus clavatus* ES1 que retiene un 72 % de actividad (Hajji et al., 2007). En el proceso de inactivación de las proteasas por parte de los agentes oxidantes se ha identificado como diana a los residuos de metionina presentes en la cercanía de los sitios activos. Todas las subtilisinas presentan un residuo de metionina al lado del residuo de serina en el sitio activo, razón por la cual, es muy común que las serin-proteasas sean inactivadas en mayor o menor grado en presencia de estos agentes, exhibiendo una baja estabilidad. En el caso de las subtilisinas utilizadas en la industria de los detergentes, para superar esta deficiencia es que han sido modificadas por ingeniería de proteínas (Estell et al., 1985). No obstante el hecho de contar con una proteasa que naturalmente sea estable a este tipo de químicos la hace potencialmente atractiva para su aplicación en este tipo de industrias.

### *6.- Determinación de los parámetros cinéticos*

A fin de determinar las constantes cinéticas de la enzima, se determinaron las velocidades iniciales con diferentes concentraciones de azocaseína a 37 °C y pH 9.0. El rango de concentraciones para azocaseína utilizadas fueron de 0.125 – 10 mg/ml. Como se puede observar en la Figura 5, la cinética de hidrólisis de la azocaseína puede ser descrita por una cinética del tipo de Michaelis-Menten la cual responde a una ecuación del tipo

$$V = V_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_m + S}$$

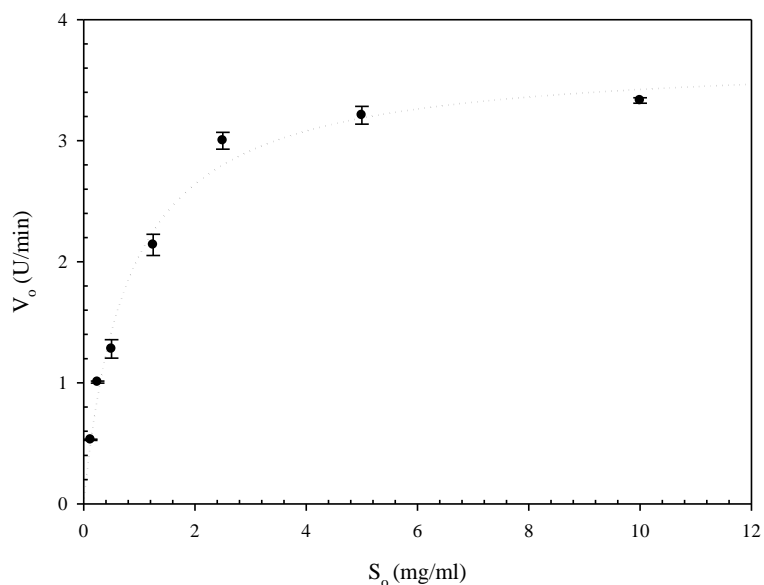


Figura 5. Gráfica de Michaelis-Menten. Velocidad inicial en función de la concentración inicial de sustrato

Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  fueron calculados a partir de la transformación de Hanes-Hultin (1967)

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{S_0}{V_{m\acute{a}x}}$$

donde  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato y  $V_0$  la velocidad inicial de la reacción.

La Figura 6 muestra la gráfica de esta ecuación, de la misma pueden determinarse fácilmente los parámetros cinéticos de la enzima. Esta transformación tiene la ventaja con respecto a las demás linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten de que no agrupa los datos lejos del origen tal como lo hace la doble recíproca o de Lineweaver-Burk sino que distribuye uniformemente los datos a lo largo de la gráfica.

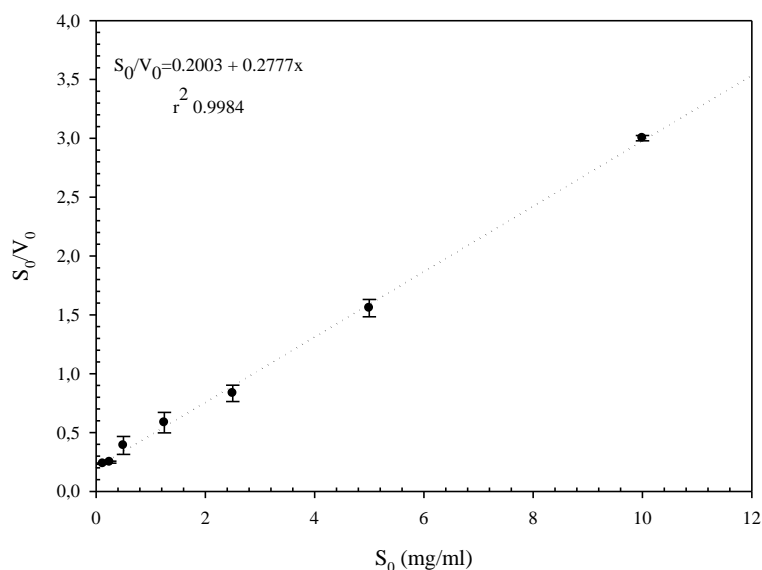


Figura 6. Gráfica de Hanes-Hultin

El  $K_m$  para la reacción de hidrólisis del sustrato azocaseína fue de 0.72 mg/ml y su  $V_{máx.}$  fue de 3.6 U/ml, dichos valores fueron calculados a través de la regresión de la ecuación antes mencionada. Este valor de  $K_m$  es similar al reportado para la queratinasa de *Chryseobacterium* sp. kr6 ( $K_m$  0.75 mg/ml) reportado por Silveira et al. (2009), mayor que el reportado por Ghosh et al. (2008) para la queratinasa de *B. cereus* DCUW ( $K_m$  0.161 mg/ml) y menor que el reportado para la queratinasa de *Bacillus* sp. P45, con un  $K_m$  de 2.85 mg/ml (Daroit et al., 2010). Este valor confirma que la concentración elegida para la medida de la actividad proteolítica en el capítulo 2 es la correcta ya que es mayor que  $10 \times K_m$ .

#### 7.- Hidrólisis de sustratos proteicos - especificidad de sustrato

La capacidad de la queratinasa de hidrolizar distintos sustratos proteicos se analizó utilizando un grupo de sustratos cromogénicos. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, los sustratos fueron divididos en sustratos insolubles: azul de queratina, azul de polvo piel (*hide poder azure*, HPA), azo-colágeno (*azocoll*), rojo de elastina (*elastin congo red*), azoqueratina y solubles: azoalbúmina y azocaseína. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 donde se expresan la velocidad de hidrólisis de estos sustratos como U/ml (definidas convenientemente para cada sustrato).

*Purificación y caracterización*

Tabla 2. Especificidad de sustrato de la queratinasa de *P. lilacinum* frente a diferentes sustrato solubles e insolubles

Sustrato	Absorbancia de medida (nm)	U/ml
<i>Solubles</i>		
azocaseína	440	3.1 ± 0.6
azoalbúmina	440	1.75 ± 0.1
<i>Insolubles</i>		
azoqueratina	440	34.6 ± 1.2
Azul de queratina	595	0.81 ± 0.1
Azo-colágeno	520	80.1 ± 2.6
Azul de polvo piel	595	1127.6 ± 7.3
Rojo de elastina	495	13.1 ± 2.3

Se observó que la enzima posee la capacidad de hidrolizar en menor o mayor medida todos los sustratos que se probaron. La baja actividad frente al sustrato azul de queratina está relacionada con la naturaleza de este sustrato. Se trata de lana de oveja impregnada con el colorante Remazol Brilliant blue. Dentro de los sustratos queratínicos, este es el más difícil de hidrolizar porque es el que presenta mayor contenido de puentes disulfuro (Barone et al., 2005). Sin embargo cuando se calcula la relación azoqueratina/azocaseína y azul de queratina/azocaseína, se obtienen valores de 11.2 y 0.26, respectivamente, valores mayores que los reportados para la queratinasa de *B. subtilis* S14 que presenta relaciones de 0.30 y 0.012 (Macedo et al., 2008). En general, la mayoría de las queratinasas reportadas son capaces de hidrolizar esta gama de sustratos, como por ejemplo, queratinasas producidas por microorganismos como *Streptomyces pactum* DSM40530 (Böckle et al., 1995); *F. islandicum* AW-1 (Nam et al., 2002), *P. marquandii* y *D. microsporus* (Gradišar et al., 2005), etc.

8.- Análisis de huellas peptídicas – identificación de la enzima

El análisis de huellas peptídicas se realizó mediante una digestión trípica in situ de la enzima queratinasa presente en un SDS-PAGE. Los péptidos obtenidos de esta digestión se analizaron por un espectrofotómetro de masa MALDI TOF/TOF. La

## *Purificación y caracterización*

proteína se identificó utilizando el programa MASCOT y la base de datos NCBIInr. Al analizar los resultados con la base de datos NCBIInr se encontraron similitudes con ciertos péptidos de una proteasa degradadora de cutícula (Cuticle-Degrading Protease) de *Paecilomyces lilacinus* (P1646) (gi|268612245) (52 % de homología, incluidos los péptidos del extremo N y C-terminal). También comparte homología con la serin-proteasa reportada por Bonants et al. (1995) (Swiss-Prot No. Q01471; NCBI 3F7O\_A) y por la reportada por Kahn et al. (2003).

En la Figura 7 se muestra el espectro de masas obtenido para la queratinasa de *P. lilacinum* y en la Tabla 3 se muestran las secuencias de aminoácidos que son homologas a la secuencia de la proteasa de *P. lilacinus* (P1646). Mayores detalles concernientes a dicho análisis se pueden encontrar en el link que se detalla a continuación:

[http://www.matrixscience.com/cgi/protein\\_view.pl?file=../data/20110406/FftpInSTt.dat&hit=1](http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20110406/FftpInSTt.dat&hit=1).

En la tabla se han marcado dos residuos de cisteínas que se encontrarían en nuestra proteína, en la proteasa gi|268612245 y también en la reportada por Bonants et al. (1995). Sin embargo, en estas dos últimas están presentes también dos cisteínas en posición 126 y 253, las cuales formarían puentes disulfuro con las cisteínas en posición 36 y 181, respectivamente; haciendo a estas enzimas resistentes a la inhibición por compuestos mercuriales, cosa que no se observó bioquímicamente con la queratinasa reportada en esta tesis. Comparando con la reportada por Khan et al. (2003) comparte todos los péptidos encontrados en su MALDI/TOF MS, pero bioquímicamente difieren en su estabilidad al pH. La proteasa reportada por estos autores se inactiva a pHs mayores que 12, en tanto que nuestra queratinasa a pH 13.0 conservó un 91 % de su actividad. Razón por la cual, se creería que si bien la queratinasa comparte el extremo N- y C-terminal y algunos péptidos más con estas proteasas, basándonos en la bioquímica, nos encontraríamos frente a una nueva proteasa producida por *P. lilacinum*.

Tabla 3. Péptidos de la secuencia de *P. lilacinum* homólogos a las de la secuencia de la proteasa gi|268612245

*Purificación y caracterización*

Peptide position	Matched masses	Matched Cys_PAM	Peptide sequence
1-14	1501.7534		AYTQQPGAPWGLGR ↓
21-54	3543.5622	Cys36:3614.5857	GSTTYEYDTSGGSGT <b>C</b> AYVIDTGVEASHPEFEGR
98-122	2534.1885		VLDNSGSGSYSGIISGMDFAVQDSK
98-124	2777.2483		VLDNSGSGSYSGIISGMDFAVQDSKSR
141-153	1303.6455		AQSVNDGAAAMIR
154-192	3740.7996	Cys181:3811.8401	AGVFLAVAAGNDNANAANYSPASEPTV <b>C</b> TVGATTSSDAR ↓
263-284	2192.0811		NVLTGIPSGTVNYLAFNGNPSG

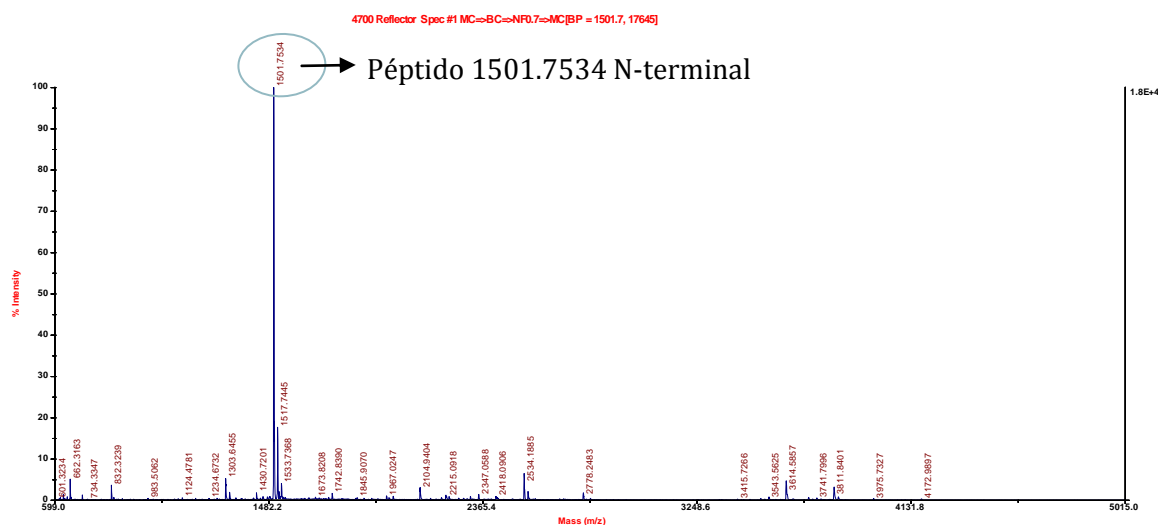


Figura 7. Espectro de masas obtenido en modo reflector positivo de la queratinasa de *P. lilacinum* LPSC # 876.

*9.- Determinación de la secuencia N-terminal de la queratinasa de P. lilacinum*

El extremo N-terminal de la queratinasa purificada se determinó como servicio externo en Tufts University, Boston, MA, EE.UU. Un total de 9 residuos pudieron ser identificados exitosamente. Mediante una exploración en la base de datos de SwissProt/TrEMBL, se buscó similitud en la secuencia con otras proteasas o

*Purificación y caracterización*

queratinasas ya reportadas. En la Tabla 4 se presenta el alineamiento de la secuencia del extremo N-terminal de la queratinasa de *P. lilacinum* junto con los extremos N-terminal de otras proteasas y queratinasas reportadas. La mayor homología (8 de 9 residuos) se encontró en la secuencia de una serin-proteasa de otra especie del mismo género, *P. marquandii* y con secuencias de serin-proteasas producidas por la misma especie (D2KLJ3 y Q01471). Sin embargo, presentó muy poca homología con el N-terminal de la serin-proteasa tiol-dependiente reportada por Kotlova et al. (2005). Al revés de lo que sucedía en el apartado anterior, la queratinasa purificada en esta tesis y la de Kotlova et al. (2007) poseen rasgos bioquímicos similares en cuanto a perfil de inhibición (incluyendo compuestos mercuriales), peso molecular, etc; pero difieren en el extremo N-terminal, lo cual nos indicaría que se trata de otra serin-proteasa tiol-dependiente.

Tabla 4. Alineamiento de las secuencias de los extremos N-terminal de la queratinasa de *P.lilacinum* LPSC #876 y algunos extremos N-terminal de queratinasas y proteasas. En rojo se señalan los aminoácidos que resultaron ser idénticos. El número de entrada a SwissProte/TrEMBL o la cita donde se reporta el extremo N-terminal se encuentra entre paréntesis, seguido al microorganismo de donde fue purificada la enzima.

Enzima	Secuencia
Queratinasa de <i>P. lilacinum</i> LPSC #876 (query)	AYTQPGAI
Serine protease <i>Purpureocillium lilacinum</i> (D2KLJ3)	AYTQPGAPWGLG
Serine protease <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Q01471)	AYTQPGAPWGLG
Serine protease <i>Pseudallescheria boydii</i> (Q10721)	AYTGQTGAPWGL
Subtilisin like serin protease AS-E2 <i>Acremonium</i> sp. (P85157)	AYVSQSGAPWGLG
alkaline protease of <i>A. chrysogenum</i> (P29118)	ALVTQNGA-WGLG
Proteinase K (P06873)	- -AAQTNA PWGLA
thiol-dependent serine protease <i>P. lilacinus</i> (Kotlova et al., 2007)	GATTQGATG
keratinase of <i>P. marquandii</i> (Gradisar et al., 2005)	ALTQPGAPWGLG

## Conclusiones

Se logró purificar con éxito la única queratinasa que expresa el hongo *P. lilacinum* LPSC # 876 cuando éste crece en presencia de residuo pelo como único sustrato. La estrategia de purificación se vio dificultada por la presencia de pigmentos producidos de la degradación de la queratina con la subsecuente liberación de melanina al medio. Luego del planteo de dos estrategias de purificación, se lograron eliminar los pigmentos mediante una cromatografía de intercambio aniónico y continuar con la purificación. El esquema general de la purificación fue el siguiente: concentración por evaporación a presión reducida, seguido de una precipitación con sulfato de amonio, eliminación de los pigmentos por medio de cromatografía de intercambio aniónica, cromatografía de intercambio catiónico y pulido por medio de una cromatografía por permeación en gel. El rendimiento total de proceso fue de 1.3 %, con un aumento de la actividad específica de 19.8 veces y una banda electroforéticamente homogénea según el análisis por SDS-PAGE de 37 KDa. Las características bioquímicas más relevantes de esta enzima resultaron ser su estabilidad a un amplio rango de pH (4.0-9.0), poseer un máximo de actividad en el rango de pH de entre 7.0 y 12.0, con un 91 % de actividad aún a pH 13.0. Ser relativamente estable a la temperatura, con una vida media de 137 y 68 min a 50 ° y 55 °C, respectivamente. Por su perfil de inhibición y teniendo en cuenta el efecto de algunos cationes sobre la actividad de esta enzima, se puede concluir que la queratinasa de *P. lilacinum* es una serin-proteasa tiol-dependiente, estable a solventes orgánicos, agentes oxidantes y detergentes. Posee la capacidad de hidrolizar una amplia gama de sustratos relacionados con componentes de la piel, como el colágeno, la elastina y la queratina, así como también presenta la capacidad de hidrolizar albúmina y caseína. Por medio de la identificación mediante el uso de huellas peptídicas y, con la determinación de su extremo N-terminal se pudo demostrar que es una proteasa/queratinasa distinta a las que han sido reportadas hasta la fecha por otras especies de *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*), compartiendo con algunas de ellas características bioquímicas y con otras características moleculares como la homología en los extremos N- y C-terminal. Siendo éste el primer reporte de la purificación y caracterización de una serin-proteasa tiol-dependiente con actividad queratinolítica de *P. lilacinum* LPSC # 876 (Cavello et al., 2013).



## *Purificación y caracterización*

Las características bioquímicas más relevantes que presenta esta enzima hacen que el campo de aplicación de la misma sea bastante amplio. Por ejemplo, en la industria del cuero, en el proceso de curtido existen varias etapas (etapa de remojo y de purga) donde se utilizan de manera rutinaria proteasas para la remoción de proteínas globulares y restos de pelos, así como también para que éstas “abran” las fibras de colágeno para facilitar la penetración de los agentes curtidores y las tinturas. También podría ser utilizada por su actividad queratinolítica y su estabilidad a pHs alcalinos, en las etapas de depilado y desencalado. Los depilados convencionales con sulfuro de sodio y cal, conducen a tener una elevada carga orgánica en el efluente de curtiembre debido a la destrucción incontrolada del pelo, además de aportar la totalidad del sulfuro presente en el efluente de la ribera. A partir de la década del '90 se han desarrollado diferentes depilados conservadores del pelo para reducir la carga orgánica, el contenido de sulfuro, y de los sólidos suspendidos sedimentables, encontrando aquí un potencial campo de aplicación.

La gran estabilidad que presenta esta enzima frente a detergentes y agentes oxidantes hace que también pueda ser aplicada en la industria de los detergentes. Actualmente muchas de las proteasas que se utilizan en esta industria son proteasas que han sido modificadas por ingeniería de proteínas, por ser éstas inicialmente poco estables frente a agentes oxidantes. Por otro lado, el hecho que la queratinasa no necesite de un cofactor como el ion calcio hace que la posibilidad de ser utilizada en la formulación de detergentes se incremente. Esto es así porque comúnmente en la formulación de los detergentes se utilizan agentes quelantes que contrarrestan la dureza del agua, removiendo el calcio presente y afectando la actividad de las proteasas calcio-dependientes.

En la industria de la cosmética, esta enzima podría ser utilizada para remoción de marcas de acné, el tratamiento de la psoriasis y eliminación de queloides, así como también en el tratamiento de enfermedades fúngicas en las uñas. Actualmente la industria Zurco bioresearch<sup>®</sup> comercializa una queratinasa de *B. licheniformis* PDW-1 expresada en *Escherichia coli* BL21 DE3 rosetta y *B. megaterium* para tales fines, en tanto que la empresa Laneige<sup>®</sup> comercializa dentro de sus productos para el cuidado de la piel un removedor de espinillas con efecto peeling a base de una queratinasa.

*Purificación y caracterización*

Mayor información acerca de estos productos se puede encontrar en las siguientes páginas webs:

[http://www.proteosbiotech.com/pdfs/pure\\_keratinase\\_100\\_en](http://www.proteosbiotech.com/pdfs/pure_keratinase_100_en)

<http://www.laneige.com/product/detail.jsp?prdtCd=214113007&lineNm=SEBUM%2c+PORE+CARE&lineCd=3209>

**Bibliografía**

- Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R., and Seghal, P.K. (2008) Purification and characterization of an extracellular keratinase from hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2741- 2745
- Barone, J.R., Schmidt, W.F., and Liebner, C.F. (2005) Thermally processed keratin films. *Journal of Applied Polymer Science* 97:1644- 1651
- Bernal, C., Cairó, J., and Coello, N. (2006) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:49-54
- Böckle, B., Galunsky, B., and Müller, R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3705- 3710
- Bonants, P.J., Fitters, P.F., Thijs, H., den Belder, E., Waalwijk, C., and Henfling, J.W. (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* 141:775- 784
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248- 254
- Brandelli, A., Daroit, D.J., and Riffel, A. (2010) Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1735- 1750
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2570- 2576
- Cai, C.G., Lou, B.G., and Zheng, X.D. (2008) Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9:60-67
- Cavello, I., Hours, R., Rojas, L., and Cavalitto, S. (2013) Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Process Biochemistry* 48:972- 978
- Chitte, R.R., Nalawade, V.K., and Dey, S. (1999) Keratinolytic activity from the broth of feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28:131- 136
- Correa, A.P., Daroit, D.J., and Brandelli, A. (2010) Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64:1- 6

*Purificación y caracterización*

- Daroit, D.J., Corrêa, A.P., Segalin, J., and Brandelli, A. (2010) Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *Biocatalysis and Biotransformation* 28:370- 379
- El-Ayouty, Y.M., El-Said, A., and Salama, A.M. (2012) Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes*. *African Journal of Biotechnology* 11:2313- 2319
- Estell, D.A., Graycar, T.P., and Wells, J.A. (1985) Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 260:6518- 6521
- Farag, A.M. & Hassan, M.A. (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34:85- 93
- Friedrich, A.B. & Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennovorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2875- 2882
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., and Haard, N.F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214:65- 69
- Ghosh, A., Chakrabarti, K., and Chattopadhyay, D. (2008) Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:825- 834
- Gradišar, H., Friedrich, J., Krizaj, I., and Jerala, R. (2005) Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3420- 3426
- Gupta, R., Beg, K., and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:15- 32
- Gupta, R. & Ramnani, P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview . *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21- 33
- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., and Gharsallah, N. (2007) Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a newly isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry* 42:791- 797
- Hultin, E. (1967) Statistical calculations of the accuracy of the Michaelis constant from viscosimetric determinations of polymetaphosphatase and dextranase activity. *Acta Chemica Scandinava* 21:1575- 1580
- Khan, A., Williams, K., and Nevalainen, H. (2003) Testing the nematophagus biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS Microbiology Letters* 227:107- 111
- Kotlova, E.K., Ivanova, M.N., Yusupova, M.P., Voyushina, T.L., Ivanushkina, N.E., and Chestukhina, G.G. (2007) Thiol-Dependent Serine Proteinase from *Paecilomyces lilacinus*: Purification and Catalytic Properties. *Biochemistry (Moscow)* 72:117- 123

*Purificación y caracterización*

- Kuo, J.M., Yang, J.I., Chen, W.M., Pan, M.H., Tsai, M.L., Lai, Y.J., Hwang, A., Pan, B.S., and Lin, C.Y. (2012) Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp. I40. *International Biodeterioration & Biodegradation* 70:111- 116
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of *bacteriophage* T4. *Nature* 227:680- 685
- Lee, H., Suh, D.B., Hwang, J.H., and Suh, H.J. (2002) Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 97:123- 133
- Lin, X., Lee, C., Casale, E., and Shih, J.C.H. (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3271- 3275
- Macedo, A.J., Silva, W.O., and Termignoni, C. (2008) Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Canadian Journal of Microbiology* 54:180- 188
- Mitsuiki, S., Ichikawa, M., Oka, T., Sakai, M., Moriyama, Y., Sameshima, Y., Goto, M., and Furukawa, K. (2004) Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardopsis* sp. TOA-1. *Enzyme and Microbial Technology* 34:482- 489
- Moallaei, H., Zaini, F., Larcher, G., Beucher, B., and Bouchara, J.P. (2006) Partial purification and characterization of a 37 KDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia* 161:369- 375
- Moreira-Gasparin, F.G., Souza, C.G., Costa, M.A., Alezandrino, A.M., Bracht, C.K., Boer, C.G., and Peralta, R.M. (2009) Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation* 20:727- 736
- Muga, A., Arrondo, J.L., Bellon, T., Sancho, J., and Bernabeu, C. (1993) Structural and functional studies on the interaction of sodium dodecyl sulfate with  $\beta$ -Galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300:451- 457
- Muhsin, T.M. & Hadi, R.B. (2001) Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia* 154:185- 189
- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., and Pyun, Y.R. (2002) Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology* 178:538- 547
- Otzen, D.E. (2002) Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophysical Journal* 83:2219- 2230
- Pillai, P. & Archana, G. (2008) Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:643- 650
- Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., and Sreeramulu, K. (2010) Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:625- 633

*Purificación y caracterización*

- Riessen, S. & Antranikian, G. (2001) Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov.; a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles* 5:399- 408
- Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C.M., Souza, G.H., Eberlin, M.N., and Tavares, F.C. (2007) Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology* 128:693- 703
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., and Brandelli, A. (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology* 179:258- 265
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., and Moncef, N. (2008) Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP 1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research* 163:299- 306
- Silveira, S.T., Jaeger, M.K., and Brandelli, A. (2009) Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. *Chemical Technology and Biotechnology* 84:361- 366
- Suntornsuk, W. & Suntornsuk, L. (2003) Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology* 86:239- 243
- Syed, D.S., Lee, J., Li.W.L., Kim, C., and Agasar, D. (2009) Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology* 100:1868- 1871
- Takami, H., Akiba, T., and Horikoshi, K. (1989) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30:120- 124
- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M.T., Kolli, N., and Mangamoori, L.N. (2008) Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology* 99:1596- 1602
- Thys, R.C.S. & Brandelli, A. (2006) Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of Applied Microbiology* 101:1259- 1268
- Walsh G (2004) Protein purification and characterization. In: *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, Wiley & Sons (ed) England, pp 89-176
- Wawrzkiwicz, K., Lobarzewski, J., and Wolski, T. (1987) Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 25:261- 268
- Yu, R.J., Harmon, S.R., Grappel, S.F., and Blank, F. (1971) Two cell-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. *The Journal of Investigative Dermatology* 56:27- 32

## Capítulo 6

*Modelado cinético de la inactivación térmica de la queratinasa de *Purpureocillium lilacinum**

*LPS#876. Efecto del agregado de agentes estabilizantes*





## Resumen

La inactivación térmica de la enzima pura se investigó, desde el punto de vista cinético, utilizando varios modelos de inactivación en un rango de temperaturas de entre 50 – 65 °C. Dentro de los modelos estudiados, la distribución de Weibull resultó ser el modelo que mejor describió la actividad enzimática residual de la queratinasa luego de los diferentes tratamientos térmicos. Al investigar el efecto del agregado de reconocidos agentes estabilizadores, se encontró que tanto la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (5 mM) como la de propilenglicol o glicerol (10 % v/v) incrementan la estabilidad térmica de la enzima.

Se estudió el efecto de la temperatura sobre los diferentes parámetros de la ecuación de Weibull y se observó que, mientras que el valor de  $b$  posee una dependencia exponencial con la temperatura, el valor del parámetro  $n$  es independiente de la misma por lo que, el modelo pudo simplificarse tomando un valor  $n$  promedio. En nuestro caso, el valor del parámetro  $n$  para la inactivación térmica de la queratinasa pura de *P. lilacinum* resultó ser de 0.6265. Se observó que en ausencia de aditivos (control) el tiempo de la primera reducción decimal –conocido como tiempo de fallo- (*reliable time*  $t_R$ , análogo al valor  $D$ ) varió dentro de un rango de tiempo de 484.16 a 63.67 min en el rango de temperaturas entre 50-65 °C, en tanto que en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  estos tiempos fueron mayores, encontrándose los mismos en un rango de entre 6221 y 414.9 min, respectivamente.

Cuando los datos de inactivación térmica se ajustaron al modelo clásico de primer orden y se compararon con los ajustados según la distribución de Weibull se observaron discrepancias entre los mismos, siendo el último modelo el que mejor ajustó a los datos experimentales. Si bien esta distribución ha sido comúnmente aplicada en el modelado de la inactivación térmica de esporos, no ha sucedido lo mismo en el estudio de la inactivación térmica de enzimas.

## **Introducción**

Como se discutió en los capítulos anteriores, las queratinasas son enzimas con un inmenso atractivo debido a la capacidad que estas poseen de degradar la queratina. Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas de acuerdo a sus características bioquímicas y moleculares (Gupta & Ramnani, 2006) y es gracias a estas características, que estas enzimas encuentran un gran campo de aplicaciones donde las enzimas proteolíticas comunes no pueden ser aplicadas (Langeveld et al., 2003; Macedo et al., 2005; Pillai & Archana, 2008).

Tanto la actividad como la estabilidad enzimática son tópicos que se encuentran directamente relacionados con la aplicación de las enzimas. Son varios los fenómenos que pueden desencadenar la inactivación enzimática incluyendo la autólisis, la agregación, la coagulación, la desnaturalización debido a la exposición a solventes, surfactantes, sales y pH y temperaturas extremas (Lencki et al., 1992a; Lencki et al., 1992b). Relacionado con los fenómenos de inactivación enzimática varias técnicas de estabilización de enzimas han sido investigadas, proporcionando biocatalizadores con mayor eficiencia, aumentando su potencial económico y biotecnológico (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

Es por esta razón que el modelado de la inactivación de una enzima es una característica importante desde una perspectiva científica y tecnológica. Los modelos matemáticos, que consisten en ecuaciones que proporcionan una cierta respuesta en base a un conjunto de datos de entrada establecidos, representan una forma poderosa y concisa de expresar el comportamiento físico en términos matemáticos (van Boekel, 2008). Por lo tanto, el uso de modelos cinéticos y estudios termodinámicos adecuados pueden permitir un mejor conocimiento del comportamiento de la enzima durante su inactivación y ayudan a plantear estrategias para incrementar su estabilidad.

Recientemente, un modelo matemático basado en la distribución de Weibull ha llamado la atención debido a su sencillez y flexibilidad (Peleg, 2002; Mafart et al., 2002; van Boekel, 2002). En general, los modelos cinéticos alternativos al modelo de primer orden son relativamente complejos porque utilizan muchos parámetros para una

## *Modelado de la inactivación térmica*

adecuada descripción de los datos. En cambio, el modelo de Weibull sólo utiliza dos parámetros para describir las curvas de supervivencia o inactivación. Ha sido aplicado con éxito para describir la inactivación de esporos de *Bacillus subtilis* por altas presiones (Heinz & Knorr, 1996) así como la inactivación térmica de diversas especies de *Bacillus* y *Clostridium* (Fernández et al., 1999; Peleg & Cole, 2000). Recientemente algunos autores han comenzado a implementar este modelo en la inactivación de enzimas: en el modelado de la inactivación de una peroxidasa presente en hojas de menta (Shalini et al., 2008), de una pectin-metil-esterasa presente en jugos de naranja (Elez-Martinez et al., 2007) y en una serin-proteasa (Sant´Anna et al., 2012).

El objetivo de este capítulo es estudiar la inactivación térmica de la queratinasa purificada de *P. lilacinum* analizando estadísticamente varios modelos cinéticos de manera de seleccionar el que mejor explique dicho comportamiento, para luego, basado en dicho modelo poder describir explícitamente la influencia de la temperatura en la inactivación térmica de nuestra queratinasa. Además de estudiar el efecto protector de los iones metálicos ( $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ) así como de los polioles (propilenglicol y glicerol) sobre la inactivación térmica.

## **Materiales y métodos**

### ***Fuente de la enzima pura***

El sobrenadante de un cultivo de *P. lilacinum* cosechado al 5to día se sometió al proceso de purificación detallado en el capítulo 5. Brevemente el proceso consistió en: (i) concentración del extracto enzimático por rotavapor a presión reducida, (ii) precipitación con sulfato de amonio (0-85% de saturación), (iii) cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Sephadex G-25, (iv) cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna DEAE-Sephadex seguido de una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna Sepharose-FF. Finalizando con una etapa de pulido mediante un paso de cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex-75. El equipo utilizado en los pasos cromatográficos fue AKTA-FPLC- U900 (Amersham, General Electric). La solución stock de queratinasa pura presentó 3.06 U<sub>azoc</sub>/ml, 34.6U<sub>azok</sub>/ml y 24 µg de prot/ml.

### ***Determinación de actividad enzimática y de contenido de proteínas***

La actividad proteolítica se midió utilizando azocaseína como sustrato, siguiendo el protocolo de medida detallado en el capítulo 2. El contenido de proteínas solubles se determinó –en el caso de ser necesario- por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

### ***Estudio de la inactivación térmica de la enzima y el efecto de los diferentes agentes protectores sobre dicha inactivación***

A fin de realizar el modelado cinético de la inactivación térmica de la queratinasa se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática incubando la misma a diferentes temperaturas en un rango de entre 50 ° y 65 °C por un período de tiempo total de 180 minutos. Durante los primeros 60 minutos de incubación, se tomaron alícuotas de la enzima incubada a cada temperatura cada 15

### *Modelado de la inactivación térmica*

min, y luego se tomaron cada 30 min hasta los 120 min para finalizar con una toma a los 180 min. A cada una de las alícuotas se le determinó la actividad proteolítica residual, utilizando azocaseína como sustrato. La actividad enzimática luego de 1 min de incubación a cada temperatura fue considerada como la actividad inicial ( $A_0$ ), eliminando de esta manera los efectos de calentamiento.

El efecto protector de ciertos polioles (propilenglicol y glicerol; 10 % v/v) así como de los iones divalentes  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  (como cloruros, 5 mM concentración final) frente a la inactivación térmica se estudió en el rango de temperatura antes mencionado, expresando los resultados como la actividad proteolítica residual y tomando el 100 % de cada experimento ( $A_0$ ) como se mencionó anteriormente, teniendo la precaución de colocarle a cada tubo su aditivo correspondiente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, expresando los resultados como la media  $\pm$  Ds.

### ***Efecto de la concentración del aditivo sobre la estabilidad térmica***

Una vez determinado cuál/es fueron los agentes que mejor estabilizaron la enzima frente a la desnaturalización térmica, se estudió el efecto del aumento de la concentración de los mismos. De esta manera, para el caso del propilenglicol y del glicerol, la concentración en la mezcla de reacción se varió desde 0 a 50 % v/v y para el caso del  $Ca^{+2}$  se probaron concentraciones dentro del rango de 0 a 10 mM. Las mezclas de reacción se incubaron a 55 °C por 1 h, al término del cual se determinó la actividad proteolítica residual y se comparó con la enzima incubada a 4 °C (100 %).

### ***Efecto del sobrenadante de un cultivo de *P. lilacinum* al ser utilizado como solvente. Estudio de la estabilidad térmica de la enzima***

Se estudió el efecto del extracto crudo inactivado térmicamente al ser utilizado como solvente para la enzima pura. Esta experiencia se llevó a cabo a una única temperatura (55 °C) y tomando alícuotas cada 15 minutos, tal como se detalló anteriormente. A cada una de las alícuotas se le determinó la actividad proteolítica

### *Modelado de la inactivación térmica*

residual y se procedió a comparar con los datos de inactivación térmica de la enzima pura y del extracto enzimático.

#### ***Modelos cinéticos de inactivación enzimática***

Considerando la estructura compleja que presentan las enzimas y la gran variedad de fenómenos que pueden ocurrir durante su desnaturalización, Lencki et al. (1992a) propusieron que dicha inactivación procedía a través de una red de reacciones (*network reactions*) que incluía, como se mencionó más arriba, reacciones de agregación, coagulación, disociación, etc. Es debido a la complejidad de las reacciones que pueden ocurrir durante la inactivación térmica de una enzima, que se han propuesto en la literatura una gran variedad de ecuaciones capaces de modelar el comportamiento cinético.

Particularmente en este trabajo se seleccionaron una serie de modelos cinéticos basados en los diferentes mecanismos de inactivación térmica, entre ellos el modelo de primer orden, el de reacciones paralelas y reacciones consecutivas. En todas las ecuaciones presentadas  $A/A_0$  representa la actividad proteolítica residual a un determinado tiempo  $t$  (min), y siendo  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) la constante cinética de la reacción a una determinada temperatura. A continuación se enumeran los modelos seleccionados:

*Cinética de primer orden* (ec. 1), esta cinética es empleada generalmente para describir la inactivación térmica y ha sido utilizada por una gran variedad de autores para modelar la inactivación térmica de una gran variedad de enzimas (Cobos & Estrada, 2003; Hasmann et al., 2007; Daroit et al., 2011).

$$A/A_0 = \exp(-kt) \quad (1)$$

*Los modelos bifásicos o paralelos* hacen referencia a la existencia de una mezcla de enzimas con diferente sensibilidad al calor o con propiedades catalíticas distintas, sugiriendo que la actividad enzimática residual puede ser descripta como la suma de dos

### *Modelado de la inactivación térmica*

decaimientos exponenciales. El primero de ellos, conocido como **modelo de isoenzimas** (*distinct isoenzymes*) sugiere que la pérdida de actividad puede ser descripta como la suma de dos decaimientos exponenciales independientes entre sí, cada uno de ellos representando a la fracción enzimática lábil ( $A_L$ ) y a la fracción enzimática resistente ( $A_R$ ) al calor, respectivamente (ec. 2).  $A_L$  y  $A_R$  representan la actividad residual de cada fracción y  $k_L$  y  $k_R$  las constantes cinéticas de primer orden de cada fracción (Weemaes et al., 1998).

$$A/A_0 = A_L \exp(-k_L t) + A_R \exp(-k_R t) \quad (2)$$

El modelo de dos fracciones presentado por Chen & Wu (1998) toma como hipótesis que una muestra cualquiera está compuesta por una gran cantidad de isoenzimas que, al igual que en el modelo anterior, pueden ser separadas en dos grupos diferentes, siendo uno de ellos térmicamente más resistente que el otro con un decaimiento exponencial de primer orden para ambos. La actividad residual se plantea como una fracción activa ( $a$ ) del grupo termolábil (Ec. 3).

$$A/A_0 = a \times \exp(-k_L t) + (1 - a) \times \exp(-k_R t) \quad (3)$$

Puede verse que, los modelos bifásicos son esencialmente similares, difiriendo solamente en las expresiones matemáticas utilizadas. Los parámetros se obtienen a través del método de regresión no lineal quasi-Newton. Simplemente las diferencias en las expresiones lineales y las formas de los diferentes modelos conducen a variaciones en los parámetros estimados (Shalini et al., 2008).

El modelo de conversión fraccional (Ec. 4) se refiere a un modelo de cinética de primer orden pero que tiene en cuenta la actividad no-nula después de un calentamiento prolongado debido a una fracción de enzima extremadamente resistente al calor ( $A_r$ ) (Rizvi & Tong, 1997; Weemaes et al., 1998)

$$A/A_0 = A_r + (A_0 - A_r) \times \exp(-kt) \quad (4)$$

## *Modelado de la inactivación térmica*

La *distribución de Weibull* es una de las muchas funciones de distribución de probabilidad continua utilizadas para describir el comportamiento de ciertos sistemas o eventos que tienen algún grado de variabilidad. Desarrollado originalmente en el año 1939 por W. Weibull para analizar estadísticamente la resistencia de los materiales, este modelo presenta un potencial interesante para la descripción de la cinética de muerte microbiana y la inactivación enzimática (Peleg & Cole, 1998; Peleg & Cole, 2000; van Boekel, 2002; Corradini & Peleg, 2004). Este modelo se basa en la suposición de que, en las condiciones examinadas, la velocidad momentánea de sensibilidad al calor es sólo factor de la intensidad de calentamiento transitorio y de la actividad residual en ese momento, pero no de la velocidad con la que se ha alcanzado la actividad residual (Weibull, 1951). La ecuación 5 representa la forma acumulada de la distribución continua de Weibull.

$$A/A_0 = \exp(-bt^n) \quad (5)$$

donde  $b$  y  $n$  son dos parámetros característicos de la distribución, el parámetro  $n$  conocido como parámetro de forma está relacionado con la concavidad de la curva, en tanto que el parámetro  $b$  emula la velocidad de reacción térmica. La dependencia con la temperatura de este último parámetro se puede expresar con una ecuación del tipo log-logist (Ec. 6) (Corradini & Peleg, 2004)

$$b(T) = \ln(1 + \exp[k'(T - T_c)]) \quad (6)$$

donde  $T_c$  es la temperatura a la cual la inactivación comienza a acelerarse y  $k'$  es la pendiente de  $b(T)$ .

### ***Análisis estadístico***

Los datos de actividad residual obtenidos a cada una de las temperaturas estudiadas fueron ajustados a los diferentes modelos cinéticos presentados anteriormente utilizando regresión no lineal con el software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). La bondad de ajuste de cada uno de los modelos fue evaluada utilizando el coeficiente de regresión ( $r^2$ ), el chi-cuadrado o error estándar del modelo ( $\chi^2$ ) y el error estándar de medias (SEM). Chi-cuadrado se ha utilizado frecuentemente para comparar



### *Modelado de la inactivación térmica*

varios modelos cinéticos de inactivación de enzimas (Chen & Wu, 1998; Corradini & Peleg, 2004) y viene dado por la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \frac{\sum (a_{\text{observado}} - a_{\text{ajustado}})^2}{(m - p)}$$

Cuando los modelos que se comparan tienen distinta cantidad de parámetros a determinar,  $\chi^2$  suelen no dar la información necesaria para poder discriminar entre varios modelos, es por eso que también se calcula el error estándar de medias (SEM) que viene dado por la ecuación:

$$SEM = \frac{\sum (a_{\text{observado}} - a_{\text{ajustado}})^2}{\sqrt{m}}$$

donde *a observado* es el valor experimental de la variable estudiada, *a ajustado* es el valor predicho por el modelo, *m* es el número de observaciones realizadas y *p* el número de parámetros a ser estimado. Por otro lado hay que aclarar que la estimación de un parámetro cinético negativo a una temperatura dada es criterio físico para el rechazo de un modelo de inactivación térmica. Aquel modelo que presente el menor valor de  $\chi^2$  y de SEM y, el mayor valor de  $r^2$  para la actividad proteolítica residual será la mejor opción desde el punto de vista estadístico.

## **Resultados y discusión**

Las características bioquímicas de la queratinasa purificada en esta tesis tal como la estabilidad a la temperatura y pH, así como su estabilidad frente a detergentes y solventes orgánicos sugieren que esta enzima puede ser aplicada en diversos procesos industriales. La estabilidad operacional de este tipo de catalizadores es una de las características más importantes y suele ser buscada para garantizar la viabilidad económica del proceso industrial. Por lo tanto, conocer la cinética de inactivación térmica así como el mecanismo para mejorar la estabilidad de la enzima son pasos necesarios para la caracterización de una enzima en particular. Una gran cantidad de trabajos relacionados con el modelado matemático de la inactivación térmica de enzimas simplemente asumen un comportamiento de primer orden sin tener presente que la elección de la mejor ecuación para el modelado del proceso es un paso esencial tanto desde el punto de vista ingenieril como económico, minimizando los errores y mejorando la eficacia del proceso que finalmente se traduce en un menor costo (Ludikhuyze et al., 1999; Cobos & Estrada, 2003; Joo et al., 2005; Silveira et al., 2010).

### ***Análisis estadísticos de los modelos cinéticos de inactivación enzimática***

Dentro de los varios modelos matemáticos propuestos para explicar la inactivación térmica de ciertos compuestos biológicos, se seleccionaron cinco de ellos con el fin de ajustar los datos experimentales obtenidos al someter la queratinasa de *P. lilacinum* a una serie de tratamientos térmicos y mediante un análisis estadístico seleccionar el que mejor ajuste (van Boekel, 2008). En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en término de  $r^2$ ,  $\chi^2$  y SEM para cada uno de los modelos. Se observa que el modelo de cinética de primer orden no arroja buenos valores de  $r^2$  ni tampoco lo hacen los modelos basados en la existencia de dos fracciones con una cinética de inactivación también de primer orden.

*Modelado de la inactivación térmica*

Tabla 1. Análisis estadístico de los modelos seleccionados para el ajuste de los datos de inactivación térmica de la queratinasa de *P. lilacinum*

	$r^2$	$\chi^2$	SEM	Comentarios
Cinética de primer orden	[0.893;0.981]	[0.0025;0.0092]	[0.0051;0.0227]	Rechazado: bajo $r^2$ , altos SEM y $\chi^2$
Distribución de Weibull	[0.987;0.999]	[4.8E-5;0.00041]	[0.0001;0.0013]	Aceptado: alto $r^2$ y bajos SEM y $\chi^2$
Modelo de isoenzimas	[0.921;0.981]	[0.0024;0.0133]	[0.0034;0.0189]	Rechazado: parámetros estimados negativos
Modelo de dos fracciones	[0.914;0.998]	[0.0002;0.0073]	[0.00041;0.012]	Rechazado: parámetros estimados negativos
Modelo de conversión fraccional	[0.956;0.991]	[0.0012;0.0022]	[0.0021;0.0039]	Rechazado: bajo $r^2$ y altos SEM y $\chi^2$

*Modelado de la inactivación térmica*

Se observa que el modelo que mejor ajusta los datos experimentales obtenidos es la distribución de Weibull con un valor de  $r^2$  más alto que el obtenido para los demás modelos y un  $\chi^2$  y SEM más bajo. Este resultado se ve también reflejado al momento de realizar una grafica de los datos experimentales y tratar de ajustar los mismos a una cinética de primer orden y a la distribución de Weibull. Claramente se observa un mejor ajuste con este último modelo (Figura 1A y B).

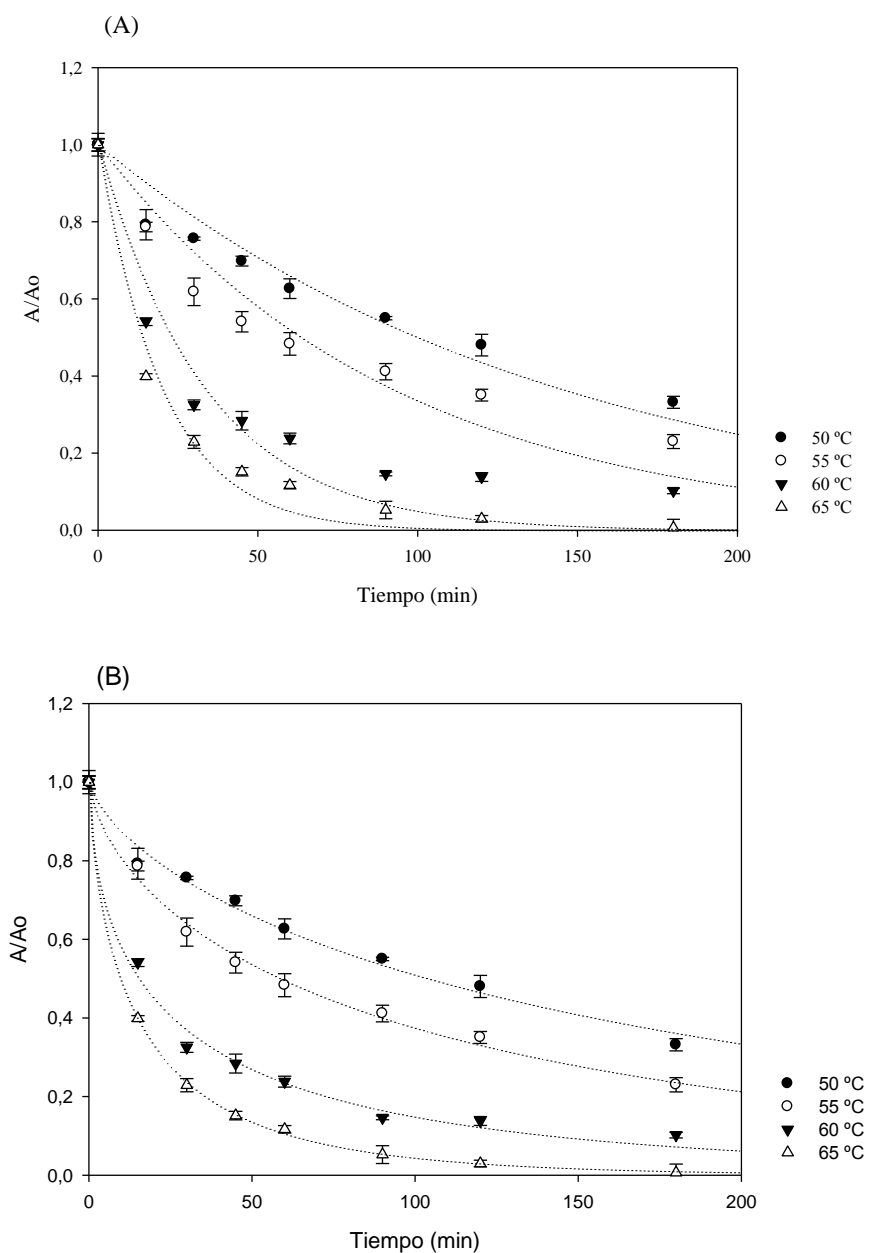


Figura 1. Ajuste de los datos experimentales de la actividad residual  $A/A_0$  de la queratinasa de *P. lilacinum* a diferentes temperaturas. A) datos ajustados a una cinética de primer orden y B) datos ajustados al modelo de distribución de Weibull

*Modelado de la inactivación térmica*

En la Figura 2 se observa el comportamiento lineal entre los valores experimentales de la actividad residual de la queratinasa de *P. lilacinum* a cada temperatura y los valores predichos utilizando la distribución de Weibull, en esta figura claramente se puede observar que todos los datos experimentales caen dentro del intervalo de confianza señalado con líneas discontinuas.

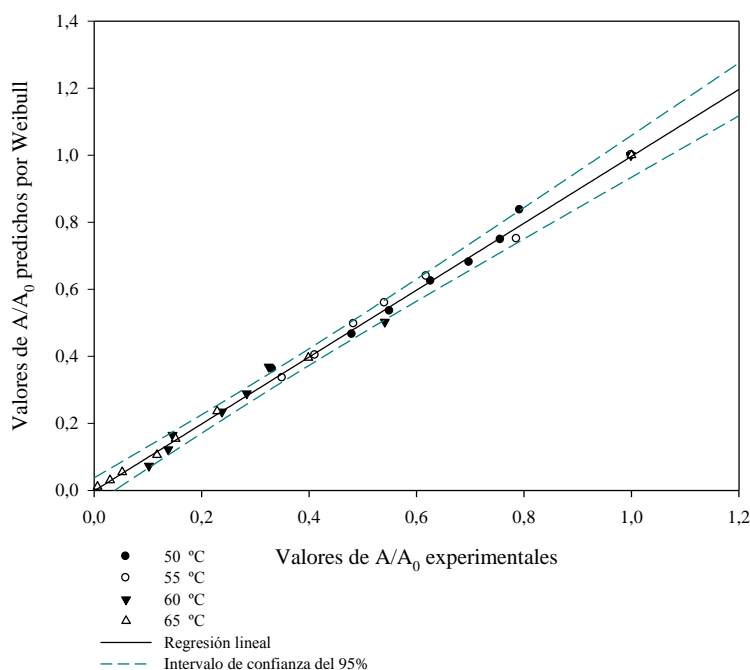


Figura 2. Paridad entre los datos experimentales de A/A<sub>0</sub> y los valores predichos por el modelo de Weibull

***Dependencia de los parámetros cinéticos de modelo de Weibull con la temperatura***

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, la distribución de Weibull se caracteriza por los dos parámetros *b* y *n*. El parámetro *b* de esta distribución emula la velocidad de reacción térmica, determina la escala y es característico de cada reacción, en tanto que el parámetro *n* da idea de la concavidad de la curva. Una distribución de Weibull con *n* > 1 indica que la curva de inactivación térmica presenta concavidad hacia abajo, en tanto que si *n* < 1 la concavidad de la misma es hacia arriba. Cuando *n* = 1 la distribución de Weibull toma la forma de una distribución exponencial

*Modelado de la inactivación térmica*

de primer orden (van Boekel, 2002). En la Tabla 2 se presentan los valores de los parámetros  $b$  y  $n$  de la distribución de Weibull para el ajuste de los datos de actividad residual a diferentes temperaturas (50-65 °C) para la queratinasa de *P. lilacinum*.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la distribución de Weibull obtenidos al ajustar los datos de actividad residual en función del tiempo a distintas temperaturas para la queratinasa de *P. lilacinum*

Temperatura (°C)	$r^2$	$b$ (min <sup>-1</sup> )	$n$
50	0.9875	0.0269	0.699
55	0.9918	0.0483	0.653
60	0.9922	0.1603	0.537
65	0.9996	0.1770	0.617

Se observa que los valores de  $n$  para todas las temperaturas estudiadas son menores que 1 indicando que las curvas presentan concavidad hacia arriba (lo cual se desprende también del gráfico 1B). El hecho de que  $n$  sea menor que 1 sugiere un fenómeno de cola (*tailing phenomena*) que indica que las moléculas de enzima presentan diferentes susceptibilidades a la inactivación durante el tratamiento térmico: las moléculas más sensibles al calor se inactivan primero y las restantes presentan más resistencia a la inactivación e incluso pueden llegar a adaptarse a las condiciones de tratamiento (van Boekel, 2002; Sant’Anna et al., 2012). Al evaluar la dependencia de este parámetro con la temperatura se observa que el mismo no sigue un patrón determinado, manteniéndose relativamente constante y al realizar un análisis de ANOVA se observa que entre ellos no existe diferencia estadística significativa, es más, al graficar  $n$  (T) vs T se observa que en realidad no existe dependencia alguna, por lo que este parámetro puede ser considerado constante (Figura 3). Este tipo de comportamiento fue reportado por varios autores, Cunha et al. (1998), van Boekel (2002), Fernández et al. (2002); Coubert et al. (2005). Estos autores coinciden en que el parámetro de forma  $n$  debe ser considerado un indicador de comportamiento del sistema, el cual da idea del patrón cinético del proceso en estudio y es por lo tanto independiente de factores externos como la temperatura, el pH y la actividad acuosa y puede considerarse constante.

*Modelado de la inactivación térmica*

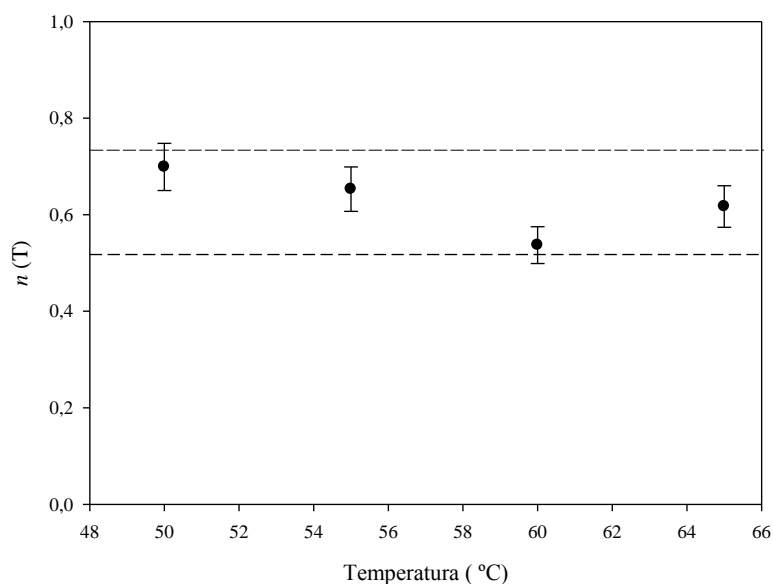


Figura 3. Parámetro de la forma  $n$  y su intervalo de confianza del 95 % (líneas discontinuas) a diferentes temperaturas basado en el modelo de distribución de Weibull

Considerando el parámetro  $n$  constante e igual a un valor medio de  $0.6265 \pm 0.068$  se procedió a calcular nuevamente el parámetro  $b$  a cada temperatura a fin de estudiar su dependencia con la misma. Estos nuevos valores de  $b$  se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores estimados para el parámetro  $b$  de la distribución de Weibull, tomando el parámetro  $n$  constante e igual a 0.6265

Temperatura (°C)	$r^2$	$b$ (min-1)	$tR$ (min)
50	0.9830	0.0371	726.8
55	0.9918	0.0538	401.6
60	0.9922	0.1145	120.4
65	0.9996	0.1715	63.1

Se observó que este parámetro aumentó a medida que lo hizo la temperatura y se pudo expresar esta dependencia algebraica mediante la ecuación log-logistic (6)

$$b(T) = \ln(1 + \exp[k'(T - T_c)])$$

*Modelado de la inactivación térmica*

donde  $T_c$  es la temperatura a la cual la inactivación comienza a acelerarse y  $k'$  es la pendiente de  $b(T)$ . Valores altos de  $k'$  y valores bajos de  $T_c$  indican que el compuesto en estudio es susceptible a la degradación térmica y se puede inferir que, cualquier factor que incremente la susceptibilidad de la enzima a la temperatura hará que  $k'$  se incremente y  $T_c$  disminuya y viceversa (Peleg, 2002). El ajuste de los valores del parámetro  $b$  a la ecuación log-logist se muestra en la Figura 4. El valor de  $T_c$  – temperatura a la cual la inactivación térmica comienza a acelerarse- resultó ser de 80.23°C. Este valor de temperatura es superior al reportado para la proteasa P7 de *Bacillus* sp. reportada por Sant’Anna et al. (2012) cuyo valor de  $T_c$  es 70.35°C. El significado operacional de este valor de temperatura es que la queratinasa de *P. lilacinum* puede ser aplicada en procesos cuyas temperaturas lleguen hasta los 80°C (Sant’Anna et al., 2012).

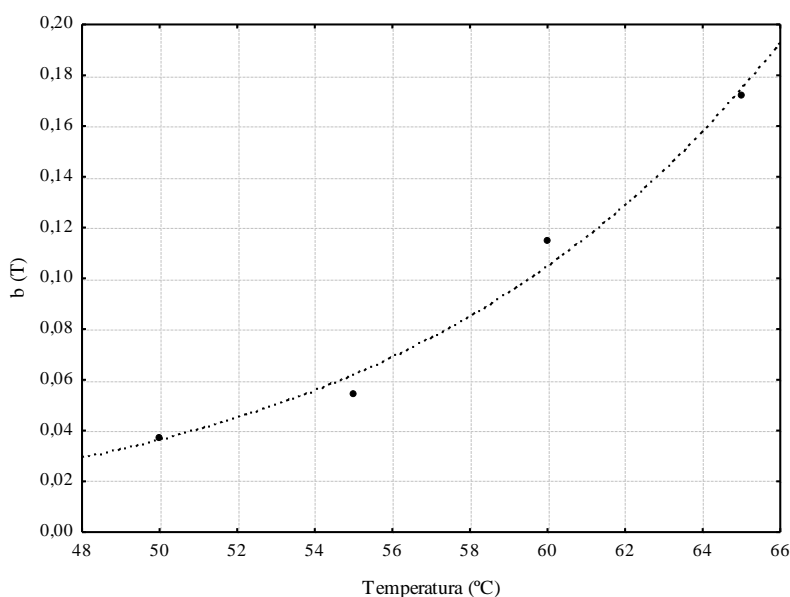


Figura 4. Dependencia del parámetro  $b$  de la distribución de Weibull con la temperatura. Los datos se ajustaron a la ecuación log-logistic  $b(T): \ln(1 + \exp [0.108(T - 80.23)])$   $r^2: 0.9846$

***Estudio del efecto del agregado de iones y polioles sobre la estabilidad térmica de la queratinasa de P. lilacinum***

Como se mencionó anteriormente la distribución de Weibull fue desarrollada para describir el comportamiento de sistemas o eventos que tuvieran un cierto grado de



### *Modelado de la inactivación térmica*

variabilidad, como por ejemplo, la fuerza de los materiales. Dentro de ese concepto ingenieril, se desarrolló el concepto de tiempo de confianza (reliable time,  $tR$ ) que es el percentil 90 % de la distribución de tiempo de fallo. Van Boekel (2002) utiliza este concepto de tiempo de confianza como el tiempo necesario para reducir el número de microorganismos o de moléculas e incluso la actividad enzimática en un factor de 10. (análogo al valor D). Este tiempo de fallo  $tR$  viene dado por la ecuación (7):

$$tR = \left[ \frac{2.303}{b} \right]^{\frac{1}{n}} \quad (7)$$

Y, aplicado al concepto de inactivación enzimática será el tiempo necesario para que la proporción de moléculas activas sea 10, o el tiempo necesario para que se pierda el 90% de actividad y solo quede un 10% de actividad residual. Generalizando la ec. (7) se obtiene que:

$$tR = \left[ -\frac{\ln A/A_0}{b} \right]^{\frac{1}{n}} \quad (8)$$

En enzimología, el tiempo de vida media de una enzima ( $t_{1/2}$ ) hace referencia al tiempo al que la actividad enzimática se reduce a la mitad (50 % de actividad residual) a una determinada temperatura. Así, utilizando ahora la ec.7, el  $t_{(1/2)}$  y puede ser escrito de la siguiente manera:

$$t(1/2) = \left[ \frac{0.693}{b} \right]^{\frac{1}{n}} \quad (9)$$

El efecto de ciertos metales como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , así como del glicerol y del propilenglicol sobre la estabilidad térmica de la enzima se estudió adicionando cada uno de estos agentes en una determinada concentración y de manera individual a una determinada cantidad de enzima pura, tomando muestras a diferentes tiempos y determinando luego la actividad residual. A los efectos de comparar los resultados obtenidos en ausencia y presencia de estos aditivos, se analizaron los resultados obtenidos en cada experiencia aplicando la distribución de Weibull. De esta manera para cada una de las situaciones planteadas se obtuvo un valor de  $b$  y un valor de  $n$ . Con cada par de valores se calculó el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y  $tR$ . Teniendo presente

*Modelado de la inactivación térmica*

que, cualquier factor que aumente la estabilidad térmica de la enzima va a tener un efecto positivo sobre  $t_{1/2}$  y sobre  $tR$ , se pudo observar que a todas las temperaturas ensayadas, la estabilidad térmica se vio incrementada por la presencia de  $Ca^{+2}$ , propilenglicol y glicerol (en ese orden), en tanto que el ion  $Mg^{+2}$  no tuvo efecto alguno sobre la estabilidad e incluso en algunas de las temperaturas estudiadas (50 y 60 °C) llegó a disminuir la estabilidad de la misma (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la presencia de aditivos en la estabilidad térmica de la queratinasa de *P. lilacinum*. Cálculo de los parámetros cinéticos de la distribución de Weibull, vida media y tiempo de fallo

	T (°C)	<i>b</i> (min <sup>-1</sup> )	<i>t</i> ( <sub>1/2</sub> ) (min)	<i>tR</i> (min)
Control	50	0.0269	106.9	484.2
	55	0.0483	59.1	368.7
	60	0.1603	17.7	112.5
	65	0.1770	9.3	63.7
Propilenglicol	50	0.0197	148.5	671.7
	55	0.0269	183.2	1257.6
	60	0.2195	18.6	284.2
	65	0.1220	13.8	84.4
Glicerol	50	0.0218	136.2	626.9
	55	0.0104	134.4	546.5
	60	0.1589	18.4	153.5
	65	0.1432	11.2	70.7
$Ca^{+2}$	50	0.0139	766.5	6221.1
	55	0.0111	523.0	3217.5
	60	0.0424	109.6	667.8
	65	0.0425	67.7	414.9
$Mg^{+2}$	50	0.0229	107.2	387.7
	55	0.0417	73.2	458.1
	60	0.4665	3.2	71.6
	65	0.1698	9.9	70.0

Con respecto al parámetro cinético *b* de la distribución de Weibull, se puede observar que a una temperatura dada, este decrece en presencia de un aditivo con fuerte poder estabilizante, por ejemplo, a 50 °C el parámetro *b* es de 0.0269 en ausencia de aditivos, pero en presencia de calcio y de propilenglicol el valor pasa a ser de 0.0139 y 0.0197, respectivamente (Tabla 4).

*Modelado de la inactivación térmica*

En la Figura 5 se muestra el cociente entre el tiempo de fallo en presencia de un aditivo y el tiempo de fallo del control sin ningún aditivo ( $t_R/t_R^{\text{control}}$ ) para cada aditivo a cada temperatura. Se observa que el ion  $\text{Ca}^{+2}$  es sin duda el aditivo que ejerce el efecto protector más alto entre los aditivos estudiados, llegando a estabilizar a la enzima 13 veces más que sin aditivo a 50 °C, si bien este valor desciende al aumentar la temperatura, aún a 65 °C el valor del tiempo de fallo pasó de ser 63.7 min en ausencia de aditivos a ser de 414.9 min en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y el tiempo de vida media paso de ser de 9.3 min a 67.7 min, respectivamente, lo que se traduce en un aumento en la estabilidad de aproximadamente 7.2 veces. Como puede observarse, el efecto del propilenglicol y el glicerol es mucho menor.

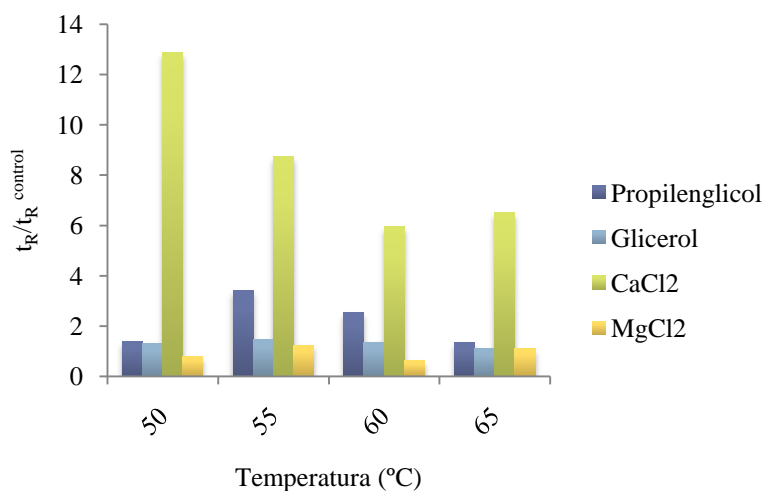


Figura 5. Cociente entre el tiempo de fallo en presencia de un aditivo en particular y el tiempo de fallo del control ( $t_R/t_R^{\text{control}}$ ) para cada aditivo a cada temperatura

La explicación del por qué estos agentes protegen a las enzimas contra la desnaturalización térmica fue discutido en el capítulo de optimización de los cultivos, brevemente se puede comentar que el aumento en la estabilidad térmica por parte de los polioles está relacionado con el refuerzo que estos compuestos ejercen sobre las interacciones hidrofóbicas presentes entre los aminoácidos no polares en las moléculas de enzimas y también con la modificación de la estructura del agua que rodea a las moléculas de enzimas (Back et al., 1979). Por otra parte, el efecto que ejerce el ion  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la estabilidad térmica se puede atribuir al fortalecimiento de

### *Modelado de la inactivación térmica*

las interacciones intramoleculares y a la unión de este metal a sitios de autólisis (Durham et al., 1987).

San't Anna et al. (2012) reportan valores de tiempos de fallo ( $tR$ ) para la proteasa de *Bacillus* sp. en un rango de valores de entre 164.41 y 8.3 min cuando trabajan en el mismo rango de temperaturas que el trabajado en la presente tesis. Se puede observar que en ausencia de cualquier aditivo que estabilice la enzima, la proteasa con actividad queratinolítica de *P. lilacinum* LPSC # 876 resultó ser mucho más estable que la reportada por estos autores.

### *Efecto de la concentración del aditivo sobre la estabilidad térmica*

Luego de observar un efecto estabilizador por parte del calcio, propilenglicol y el glicerol, se decidió estudiar el efecto de la concentración de estos agentes protectores sobre la estabilidad a fin de ver si existía una concentración óptima a la cual el efecto protector observado fuera mayor. Así, la concentración de calcio se varió en un rango de concentraciones de entre 0-15 mM y la de propilenglicol y glicerol entre 0-50 % v/v. A 55 °C, luego de 1 h de incubación y en ausencia de aditivos la enzima pura retiene cerca del 45 % de su actividad original. En presencia de calcio y de glicerol, se observó que el efecto protector se fue incrementando a medida que la concentración de los mismos se incrementaba pero, en el caso del calcio a partir de 10 mM la enzima retuvo el 100 % de actividad mientras que en el caso del glicerol y del propilenglicol, se observa que hay un valor de concentración que maximiza la estabilidad y que, por encima de ese valor la estabilidad disminuye nuevamente (Figura 6 A y B). En el caso del glicerol, la máxima estabilidad se obtuvo en presencia de un 30 % v/v (83 % de actividad residual) y en el caso del propilenglicol, a una concentración del 10 % v/v (62 % de actividad proteolítica residual).

*Modelado de la inactivación térmica*

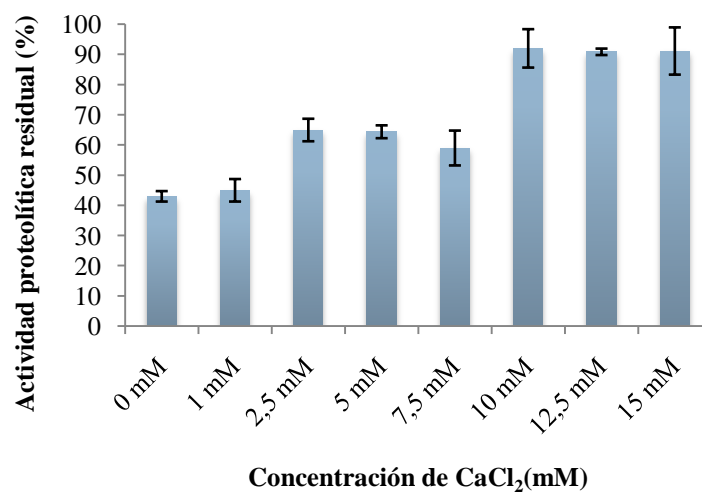


Figura 6. A) Efecto de la concentración de CaCl<sub>2</sub> sobre la estabilidad térmica de la queratinasa. Los porcentajes están referidos a una muestra control incubada a 4 °C.

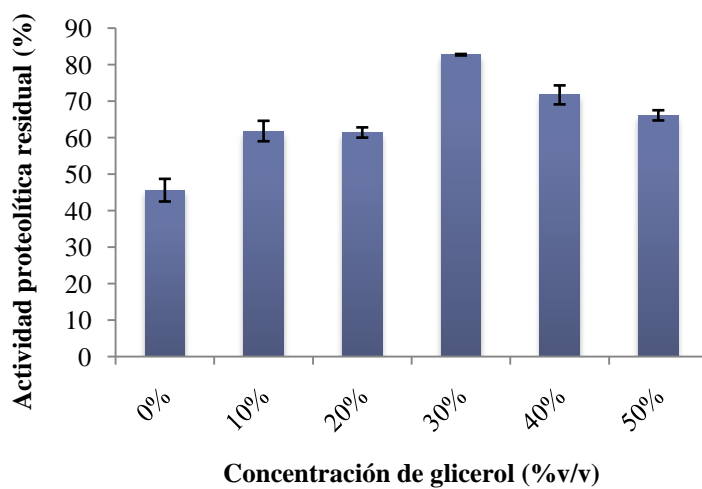


Figura 6. B) Efecto de la concentración de glicerol sobre la estabilidad térmica de la queratinasa. Los porcentajes están referidos a una muestra control incubada a 4 °C.

*Modelado de la inactivación térmica*

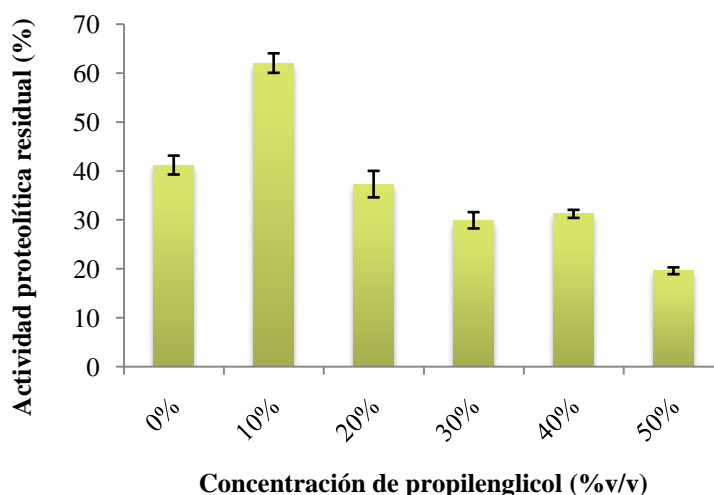


Figura 6. C) Efecto de la concentración de propilenglicol sobre la estabilidad térmica de la queratinasa.

Los porcentajes están referidos a una muestra control incubada a 4 °C.

Un comportamiento similar se observó al estudiar del efecto que ejerce la variación de la concentración de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  sobre la estabilidad térmica de la queratinasa de *Bacillus* sp. P 45. En ese caso, la máxima actividad residual a 55 °C, se observa a una concentración de calcio de 3 mM y de magnesio de 4 mM, respectivamente, la cual disminuye al aumentar la concentración de estos iones (Daroit et al., 2011). Ghorbel et al. (2003) por su parte, estudiaron el efecto del incremento de la concentración de sorbitol sobre la estabilidad térmica de una proteasa de *B. cereus* BG1. Reportan que una concentración de 5 M de sorbitol es la indicada para proveer a la enzima de un 100 % de estabilidad luego de una hora de incubación a 60 °C. Bhosale et al. (1995) al estudiar el efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la estabilidad de una proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20) encontraron que a concentraciones bajas (5 y 10 mM), éste ion no ejercía efecto protector alguno, sin embargo, a concentraciones superiores tales como 25 mM y hasta 250 mM, el ion ejerce un efecto protector importante aumentando de 0 % a 23 % la actividad residual a 50 °C, luego de una hora de incubación.

***Efecto del sobrenadante de un cultivo de *P. lilacinum* al ser utilizado como solvente. Estudio de la estabilidad térmica de la enzima***

En la literatura es muy común encontrar que el grado de pureza de una enzima tiene un gran efecto sobre su inactivación térmica. Por lo general se suele indicar que las enzimas proteolíticas se encuentran más protegidas en sus extractos crudos debido a la presencia en el medio de otras proteínas y que posiblemente la termo estabilidad enzimática se vea reducida debido a una desnaturalización parcial a la que se encuentra sometida la enzima en cada paso de purificación y al efecto de autoproteólisis a temperaturas moderadas (40-60 °C) (Schokker & van Boekel, 1999; Xiong et al., 2005). Cuando se compararon las cinéticas de inactivación térmica de la enzima pura de *P. lilacinum* y del extracto enzimático del cual procedía, se observó que a una misma temperatura, por ejemplo 55 °C, este último era menos estable, con un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de 28.6 min, en tanto que la vida media de la enzima pura era de 59.1 min. Esto llamó la atención y se decidió a continuación realizar una experiencia con el fin de confirmar el resultado y estudiar el efecto que ejercía este extracto crudo sobre la estabilidad de la enzima pura si a éste se lo utilizaba como solvente de la misma. Así, se procedió a inactivar térmicamente el extracto crudo y luego realizar las diluciones correspondientes de la enzima pura utilizando este extracto como solvente. Luego, la mezcla de reacción se incubó a 55 °C y se fueron tomando alícuotas de la misma a intervalos regulares de tiempo a fin de obtener la cinética de inactivación térmica. En la Figura 7 se observan las 3 cinéticas de inactivación: la del extracto crudo, la de la enzima pura y la obtenida al utilizar el extracto crudo como solvente.

Se encontró que cuando el extracto crudo era utilizado como solvente de la enzima pura, éste en vez de ejercer un efecto termo protector desestabilizó a la enzima, produciendo una cinética de inactivación mucho más pronunciada y rápida. Esto se pudo observar no sólo de manera gráfica, sino que cuando se analizó la cinética aplicando el modelo de distribución de Weibull se encontró que el parámetro  $b$ , aumentó significativamente de un valor de 0.062 para el extracto crudo y de 0.048 para la enzima pura a 0.2023 para la mezcla. En cuanto a el tiempo de vida media de la enzima pura cuando se utiliza el extracto crudo como solvente, el mismo cae a 14.6 min, valor que resultó ser menor aun incluso que del extracto crudo.

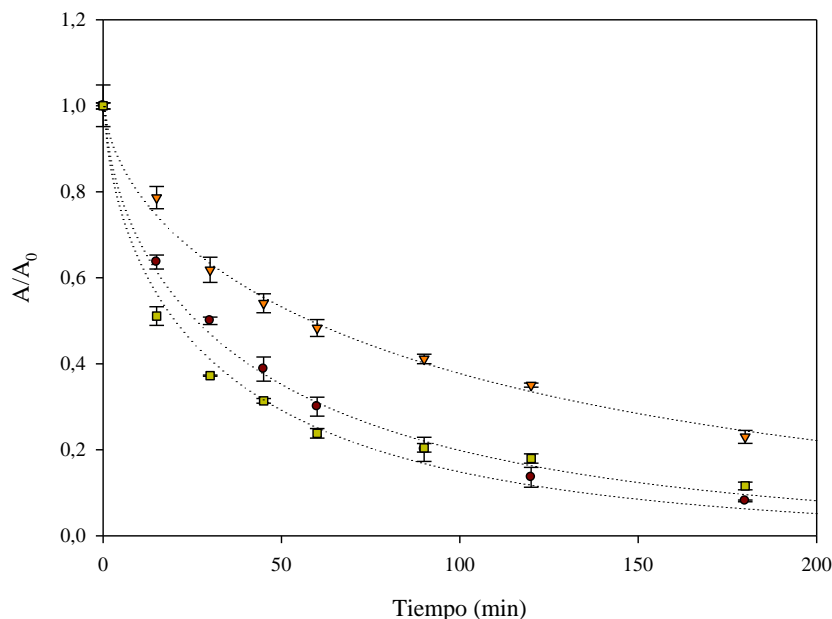


Figura 7. Cinética de inactivación térmica a 55°C. Los datos experimentales son (▼) Enzima pura; (●) Extracto crudo y (■) Extracto crudo inactivado térmicamente y utilizado como solvente. Las líneas de punto muestran las curvas ajustadas a una cinética de Weibull

Los estudios relacionados a este experimento son más bien escasos, en un trabajo de Silveira et al. (2010) si bien no se estudia el efecto del extracto crudo sobre la estabilidad térmica de la enzima pura, se estudia el efecto del grado de pureza de la misma, es decir, determinan el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) suponiendo una cinética de primer orden, y observan que mientras que el extracto crudo presenta un tiempo de vida media de 13.0 min a 50 °C, el de la proteasa pura es de 27.7 min a la misma temperatura. Schokker & van Boekel (1999) por su parte, estudiaron el efecto del agregado de caseinato de sodio sobre la inactivación térmica de una proteasa de *Pseudomonas fluorescens* 22F encontrando, que su estabilidad aumentaba de manera estadísticamente significativa en presencia del mismo. Las razones de por qué nuestra enzima es más estable a la temperatura cuando está en estado puro no se conoce.



## Conclusión

Del estudio estadístico de la cinética de inactivación térmica de la queratinasa de *P. lilacinum* se logró evidenciar que la misma no seguía una cinética de primer orden, como generalmente se cree de estas enzimas, sino que el modelo que mejor ajustaba a los datos experimentales era la distribución de Weibull. Este modelo recién ha incursionado en el ámbito de las enzimas, sin embargo ha sido y es muy utilizada en el área microbiológica para estimar los parámetros de muerte de agentes patógenos como *Listeria monocytogenes*. Hasta el momento la distribución de Weibull ha sido útil para explicar la inactivación térmica de una proteasa, una peroxidasa y una pectin-metil-esterasa, siendo este el primer reporte para una queratinasa fúngica.

Si bien el efecto de los iones como el calcio y de los polioles sobre la estabilidad térmica de las enzimas es un tema ampliamente investigado y discutido, hasta el momento no se había estudiado en términos de los parámetros de la distribución de Weibull, es decir, si el parámetro  $b$  se incrementaba o disminuía en presencia de un agente protector a una temperatura dada, etc. En este caso, se observó que este parámetro disminuye al encontrarse la enzima en presencia de un agente protector, lo cual es lógico si recordamos que este parámetro está relacionado con la velocidad de reacción. También se pudo observar que un mayor grado de protección está representado por un menor valor de  $b$ , es decir que este parámetro nos puede indicar si un agente protege más o menos que otro frente a la inactivación térmica.

Cuando los datos experimentales se ajustaron a una cinética de primer orden y se calcularon los valores de  $D$  (análogos al  $tR$ ) se observó que éstos resultaron ser bastante diferentes a los obtenidos por Weibull. Los valores de  $D$  fueron de 333.76, 211.17, 76.8 y 45.9 min, a 50, 55, 60 y 65 °C, respectivamente. Valores menores que los calculados con el modelo de Weibull. La diferencia entre ambos valores da una idea del error que suele cometerse en el estudio de la inactivación térmica cuando se asume directamente una cinética de primer orden. En nuestro caso hay una diferencia de casi dos horas entre el parámetro  $D$  y el parámetro  $tR$  a 50 °C, lo cual significa que se estaría subestimando la capacidad de trabajo del catalizador en cuanto al tiempo que éste puede ser utilizado.

**Bibliografía**

- Back, J.F., Oakenfull, D., and Smith, M.B. (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18:5191- 5196
- Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V., and Srinivasan, M.C. (1995) Thermostability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enzyme and Microbial Technology* 17:136- 139
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248- 254
- Chen, C.S. & Wu, M.C. (1998) Kinetics models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. *Journal of Food Science* 63:747- 750
- Cobos, A. & Estrada, P. (2003) Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase fro *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme and Microbial Technology* 33:810- 818
- Corradini, M.G. & Peleg, M. (2004) A model of non-isothermal degradations of nutrients, pigments and enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:217- 226
- Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., Mafart, P., and Leguérinel, I. (2005) Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology* 101:73- 81
- Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R., and Oliveira, J.C. (1998) Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering* 37:175- 191
- Daroit, D.J., Sant´Anna, V., and Brandelli, A. (2011) Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: Influence of temperature and metal ions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165:1740- 1753
- Durham, D.R., Stewart, D.B., and Stellwag, E.J. (1987) Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus sp* strain GX6638. *Journal of Bacteriology* 169:2762- 2768
- Elez-Martinez, P., Suarez-Recio, M., and Martin-Belloso, O. (2007) Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulse electric fields. *Journal of Food Engineering* 78:184- 193
- Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ocio, M.J., and Martínez, A. (2002) Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology* 77:147- 153
- Fernández, A., Salmerón, C., Fernández, P.S., and Martínez, A. (1999) Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology* 10:158- 162

## *Modelado de la inactivación térmica*

- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology* 32:513- 518
- Gupta, R. & Ramnani, P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview . *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21- 33
- Hasmann, F.A., Gurpilhares, D.B., Roberto, I.C., Converti, A., and Pessoa Jr, A. (2007) New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology* 40:849- 858
- Heinz, V. & Knorr, D. (1996) High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three–state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnology* 10:149- 161
- Iyer, P.V. & Ananthanarayan, L. (2008) Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* 43:1019- 1032
- Joo, H.S., Koo, Y.M., Choi, J.W., and Chang, C.S. (2005) Stabilization method of an alkaline protease from inactivation by heat, SDS and hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* 36:766- 772
- Langeveld, J.P., Wang, J.J., Van de Weil, D.F., Shih, G.C., Garssen, G.J., Bossers, A., and Shih, J.C.H. (2003) Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *The Journal of Infectious Diseases* 188:1782- 1789
- Lencki, W.R., Arul, J., and Neufeld, R.J. (1992a) Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics. I. First-order behavior. *Biotechnology and Bioengineering* 40:1421- 1426
- Lencki, W.R., Arul, J., and Neufeld, R.J. (1992b) Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics. II. Biphasic and grace period behavior. *Biotechnology and Bioengineering* 40:1427- 1434
- Ludikhuyze, L.R., Ooms, V., Weemaes, C.A., and Hendrickx, M. (1999) Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica alaracea* L. Cv. Italica). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1794- 1800
- Macedo, A.J., Beys da Silva, W.O., Gava, R., Driemeier, D., Pêgas Henriques, J.A., and Termignoni, C. (2005) Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:594- 596
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., and Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72:107- 113
- Peleg, M. (2002) A model fo survival curves having an activation shoulder. *Journal of Food Science* 33:531- 538
- Peleg, M. & Cole, M.B. (1998) Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38:353- 380

*Modelado de la inactivación térmica*

- Peleg, M. & Cole, M.B. (2000) Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *Journal of Food Protection* 63:190- 195
- Pillai, P. & Archana, G. (2008) Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:643- 650
- Rizvi, A.F. & Tong, C.H. (1997) Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. *Journal of Food Science* 62:1- 7
- Sant'Anna, V., Corrêa, A.P., Daroit, D.J., and Brandelli, A. (2012) Kinetic modeling of thermal inactivation of the *Bacillus* sp. protease P7. *Bioprocess and Biosystems Engineering*
- Schokker, E.P. & van Boekel, M.A.J.S. (1999) Kinetics of Thermal Inactivation of the Extracellular Proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: Influence of pH, Calcium, and Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1681- 1686
- Shalini, G.R., Shivhare, U.S., and Basu, S. (2008) Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering* 85:147- 153
- Silveira, S.T., Casarin, F., Gemelli, S., and Brandelli, A. (2010) Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162:548- 560
- van Boekel, M.A.J.S. (2002) On the use of the weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74:139- 159
- van Boekel, M.A.J.S. (2008) Kinetic modeling of food quality: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7:144- 158
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., van den Broeck, I., and Hendrickx, M. (1998) Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 60:292- 300
- Weibull, W. (1951) A statistical distribution of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics* 18:293- 297
- Xiong, Y.H., Liu, J.Z., Song, H.Y., and Ji, L.N. (2005) Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 119:348- 356

# Capítulo 7

*Inmovilización de una queratinaasa de  
Purpureocillium lilacinum LPSC#876 sobre  
esferas de quitosán*



## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

### **Resumen**

Las enzimas inmovilizadas presentan una serie de ventajas sobre las enzimas libres en solución: son más robustas y más resistentes a los cambios ambientales, pudiendo ser reutilizadas en procesos tipo *batch* y también en biocatálisis continuas. El aumento en la estabilidad de estos biocatalizadores permite su uso en condiciones más extremas de pH y temperatura.

Existen varias estrategias para la inmovilización de enzimas y la selección de la mejor estrategia debe basarse en la eficacia de la enzima inmovilizada, el porcentaje de inmovilización, el costo del proceso de inmovilización y en la toxicidad de los reactivos usados. Dentro de los métodos químicos de inmovilización se encuentra la inmovilización utilizando glutaraldehído como agente entrecruzador. Es conocida la toxicidad que este agente entrecruzador posee, reportándose casos de irritación de las vías respiratorias, piel, ojos, así como cefaleas, náuseas, etc.

En este capítulo se presenta la inmovilización de una queratinasa de *Purpureocillium lilacinum*. En primer término se realizó un estudio comparativo – variando las condiciones de activación de las esferas de quitosán - entre dos agente entrecruzantes o reticulantes: glutaraldehído y genipina (entrecruzador natural y no tóxico) a fin de seleccionar el mejor agente. Una vez seleccionado aquel agente entrecruzante que proporcionara los mejores resultados -no sólo en cuanto a porcentaje de inmovilización sino también en términos de actividad- se procedió a caracterizar el sistema. Se estudió la estabilidad al pH y temperatura, así como la reutilización y la estabilidad en el tiempo a 4 °C de la enzima inmovilizada.

## **Introducción**

Los catalizadores biológicos (enzimas) presentan una serie de características que hacen que su uso sea ventajoso por sobre el uso de los catalizadores químicos. Son capaces para catalizar modificaciones de un tipo de grupo funcional (entre varios grupos similares) existente en un tipo de sustrato en presencia de otras moléculas muy similares (especificidad de sustrato, regioespecificidad y estereoespecificidad). Estas características garantizan que la reacción catalizada no se vea perturbada por reacciones paralelas, obteniendo sólo el producto deseado sin la obtención de subproductos. Sumado a esto, las enzimas generalmente operan en condiciones de presión, temperatura y pH mucho más suaves que las que trabajan los catalizadores químicos lo que se traduce en una disminución en los costos de fabricación y de energía. Otra ventaja es que las enzimas no presentan el problema de su disposición final, porque dado que se trata de proteínas o péptidos son biodegradables lo que las hace fácilmente removibles de los efluentes líquidos (Krajewska, 2004). Sin embargo, así como existen estas ventajas indiscutibles, existen un número de problemas prácticos en el uso de enzimas como catalizadores: el costo en la producción, recuperación y purificación, la inestabilidad estructural que presentan cuando son purificadas, la desventaja de sufrir inhibición por altas concentraciones de sustrato o de productos y el hecho de que trabajan dentro de un rango de condiciones ambientales óptimas a veces acotado. Estos últimos dos ítems acortan la vida operacional del catalizador.

Entre los métodos propuestos a fin de superar estas limitaciones se encuentran técnicas de screening de nuevas enzimas (Robertson & Steer, 2004), técnicas de biológica molecular e ingeniería de proteínas (Van der Burg & Eijnsink, 2002), el diseño de reactores (Illanes & Wilson, 2003) y la inmovilización de las enzimas (Guisan, 1987; Adriano et al., 2005; Bhandari et al., 2009).

Se entiende por inmovilización de una enzima al proceso por el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser re-utilizadas repetidamente. Posteriormente, esta definición fue ampliada a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de



## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Brena & Batista-Viera, 2006).

La inmovilización de las enzimas se consigue mediante la fijación de éstas en la superficie o dentro de soportes sólidos, dando como resultado sistemas enzimáticos heterogéneos. Estos sistemas al simular lo que ocurre en la naturaleza -donde las enzimas suelen encontrarse unidas a las membranas- estabilizan la estructura de las mismas y por ende su actividad. Por lo tanto, comparadas con las enzimas libres, las enzimas inmovilizadas son más robustas y más resistentes a los cambios ambientales, presentando la posibilidad de ser separadas del producto obtenido haciendo factible la reutilización del catalizador, la operación continua de los procesos enzimáticos y la posibilidad de diseñar una gran variedad de bioreactores (Brahim et al., 2002).

Las enzimas se pueden unir al soporte a través de interacciones que van desde la adsorción física reversible y las interacciones iónicas a la unión por enlaces covalentes. Existen varias formas de clasificar a los diversos métodos para inmovilizar enzimas. Una de ellas es la que divide a éstas en dos grandes categorías: los métodos irreversibles y reversibles (Gupta & Mattiasson, 1992). El concepto de inmovilización irreversible significa que una vez que el biocatalizador es unido al soporte éste no se puede separar del mismo sin destruir ya sea la actividad biológica de la enzima o el soporte. Los métodos más comunes de inmovilización irreversible de enzimas son el acoplamiento covalente, el entrapamiento, la micro-encapsulación, y la reticulación (cross-linking) (Fig. 1).

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

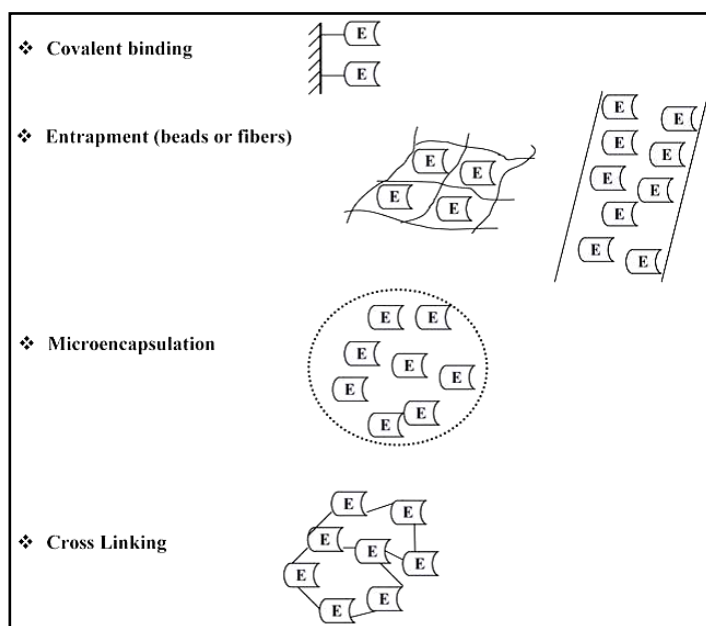


Figura 1. Métodos irreversibles de inmovilización de enzimas (Immobilization of enzymes and cells, 2d edition, capitulo 2, pp.23)

Cuando se habla de una inmovilización reversible se hace referencia a que las enzimas inmovilizadas pueden ser separadas del soporte bajo condiciones suaves (Fig. 2). El uso de métodos reversibles para la inmovilización de enzimas es muy atractivo, sobre todo por razones económicas porque cuando la actividad enzimática decae el soporte puede regenerarse y volver a utilizarse para inmovilizar enzima “fresca”. La inmovilización reversible de las enzimas es particularmente importante para la inmovilización de enzimas lábiles (Gupta & Mattiasson, 1992). Al grupo de métodos reversibles pertenecen la adsorción, la unión iónica, la inmovilización por afinidad, la unión metálica y la mediada por puentes disulfuro (Fig. 2)

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

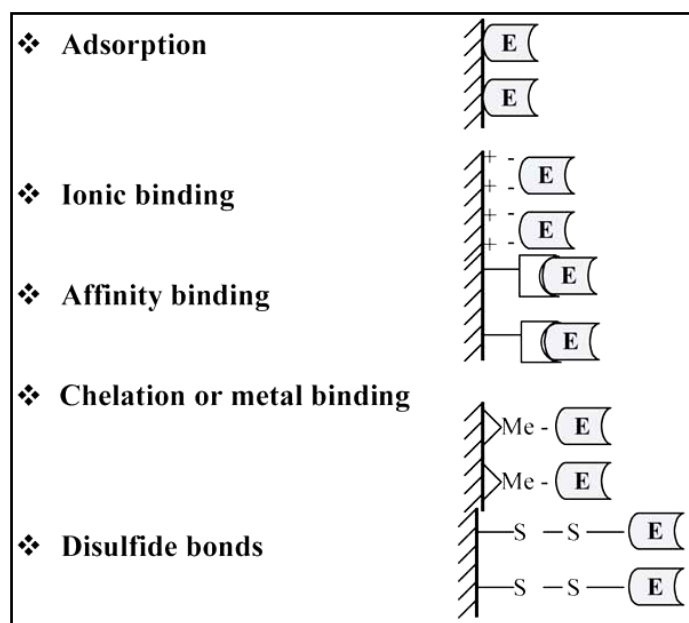


Figura 2. Métodos reversibles de inmovilización de enzimas (Immobilization of enzymes and cells, 2d edition, capítulo 2, pp.23)

Por otro lado, nos encontramos con métodos de inmovilización de enzimas por retención física y con métodos de inmovilización de enzimas por unión química. (Tischer & Wedekind, 1999). Entre los métodos de inmovilización por retención física encontramos el entrapamiento y la micro-encapsulación. En tanto que en el caso de los métodos de inmovilización química las enzimas se pueden unir al soporte mediante adsorción (la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno) o por unión covalente, siendo este último el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con ciertos aminoácidos presentes en las proteínas) o el reticulado o *cross-linking* (método que consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, etc. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Arroyo, 1998) (Fig. 3)

## Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán

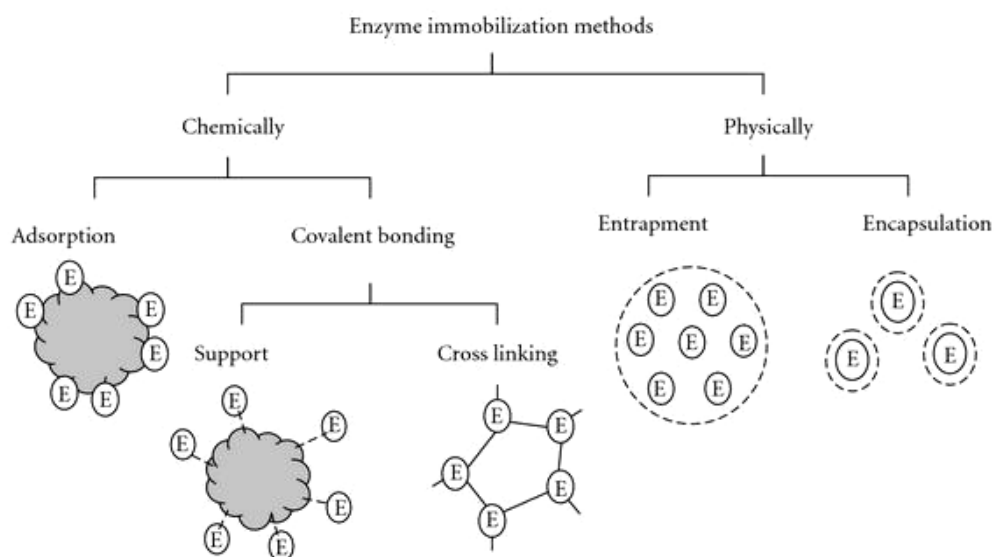


Figura 3. Métodos de inmovilización físicos y químicos (Taher et al., 2011).

La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas (Rokugawa et al., 1980; Guisan, 1987; Adriano et al., 2005; Sedaghat et al., 2009; Li et al., 2012; Spinelli et al., 2013). Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se pueden encontrar en forma de cilindro, hojas, fibras y esferas.

Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Soportes inorgánicos. Estos a su vez pueden ser *naturales* (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o *materiales manufacturados* (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)
- Soportes orgánicos. Se pueden clasificar en:

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

*Polímeros naturales:* divididos en:

Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc), Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).

*Polímeros sintéticos:* divididos en:

Poliiolefinas (como el poliestireno), Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.), Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

El soporte utilizado en este trabajo es el quitosán. Este soporte se encuentra dentro de los polímeros naturales, es un polisacárido insoluble en agua a pH neutro a alcalino, pero soluble en soluciones ácidas de pHs inferiores a 6.5 y se obtiene a partir de la *N*-desacetilación de la quitina (polisacárido constituyente principal de las conchas de los crustáceos, los exoesqueletos de insectos y de las paredes de las células de los hongos). Comercialmente, la quitina se obtiene de los residuos de la industria de procesamiento de productos pesqueros a un precio relativamente bajo (Hudson & Smith, 1998; Khor, 2002) (Figura 4).

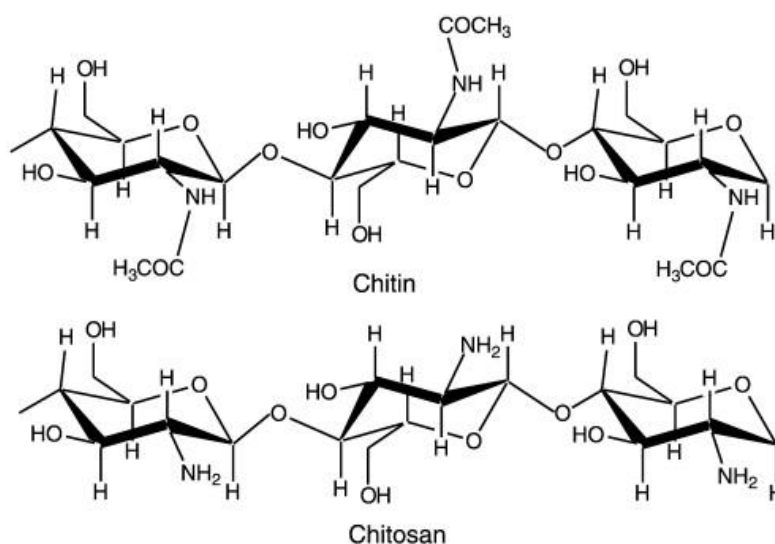


Figura 4. Estructura de Quitina y Quitosán (Dumitriu et al., 1997).

El proceso de obtención del quitosán básicamente consiste en desproteínizar los residuos de los crustáceos con una solución diluida de NaOH para luego descalcificar con una solución ácida diluida de HCl. La quitina obtenida se somete a una *N*-

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

desacetilación por medio de un tratamiento con NaOH al 40-45 %, seguido de un proceso de purificación. Este polisacárido posee una serie de características químicas y biológicas que lo hacen sumamente interesante. Posee en su molécula grupos aminos e hidroxilos susceptibles a modificaciones químicas (Hudson & Smith, 1998), además los grupos amino lo convierten en uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales capaz de solubilizarse en soluciones acuosas ácidas de pH menores que 6.5, en las cuales posee una alta carga positiva gracias a sus grupos  $-NH_3^+$ . Son estas cargas la que lo hacen ser capaz de reaccionar con compuestos polianiónicos o con quelatos de metales pesados. Ambas características hacen que este polisacárido posea la capacidad de formar geles.

Dentro de las propiedades que lo hacen una buena elección para la inmovilización de enzimas se pueden nombrar la de ser biocompatible, biodegradable, no tóxico, notablemente afin por las proteínas, y poseer propiedades hemostáticas, fungistáticas, antitumorales y anticolesterémicos, además ser seguro tanto para los seres humanos como para el medio ambiente (Krajewska, 2004).

De manera mayoritaria, el glutaraldehído ha sido elegido como agente activador o agente entrecruzador, el cual, por medio de sus grupos  $-NH_2$  interacciona por un lado con la superficie del quitosán y por el otro con la enzima a inmovilizar (Krajewska, 2004). En la Figura 5 se muestra esquema de la inmovilización de la enzima queratinasa sobre esferas de quitosán utilizando glutaraldehído como agente activador basado en el modelo propuesto por De-Sheng et al. (2005) para la inmovilización de la enzima Lacasa.

Así como la Lacasa, una gran cantidad de enzimas de relevancia industrial también han sido inmovilizadas utilizando este *cross-linker*, entre las cuales se pueden destacar:  $\beta$ -galactosidasa (Zhou & Chen, 2001),  $\beta$ -amilasa (Xia et al., 2003), invertasa (Bahar & Tuncel, 2001), penicillin G acilasa (Koilpillai et al., 1990), celulasa (Wu et al., 2005), etc.

El glutaraldehído presenta, sin embargo, varios efectos adversos sobre la salud, tales como irritación en piel, ojos y mucosas respiratorias, cefalea, náuseas y asma ocupacional (Goncalo et al., 1984; Burge, 1989; Quirce et al., 1999). Razones más que suficientes para la búsqueda de nuevos agentes entrecruzantes que tengan menor o nula toxicidad y sean más amigables con el medio ambiente.

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

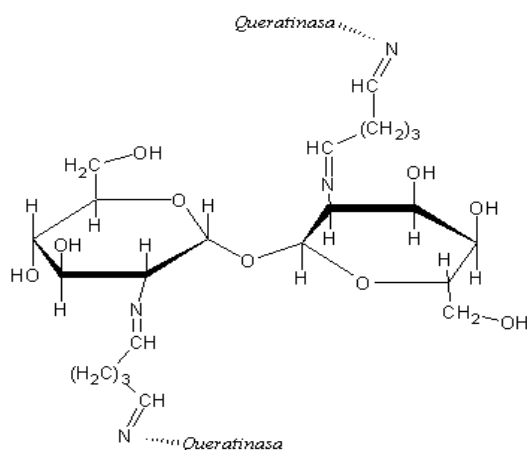
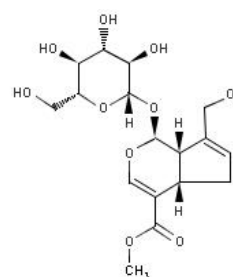


Figura 5. Esquema de la inmovilización de la enzima Queratinasa

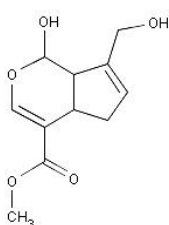
Como alternativa menos tóxica al glutaraldehído surge un agente entrecruzante natural llamado genipina. La genipina se obtiene por hidrólisis enzimática ( $\beta$ -glucosidasa) de un glucósido iridoide conocido como genipósido presente en frutos de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides* Ellis y constituye aproximadamente entre un 4-6 % del peso del fruto seco (Figura 6).



Fruto de la *Gardenia jasminoides* Elli



Genipósido



Genipina

Figura 6. Esquema donde se indica el origen del agente reticulante Genipina

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

*Genipa americana* se encuentra en la zona tropical de América, desde México y el Caribe a la Argentina, donde es ampliamente plantada por su sombra y frutos. Los frutos, con un sabor similar al membrillo, se comen crudos o se utilizan para hacer bebidas refrescantes. También se utiliza como un diurético y como remedio para las dolencias respiratorias. Por su parte, *Gardenia jasminoides* se cultiva en el Lejano Oriente, y sus frutos han sido utilizados en medicina china como anti-inflamatorio, diurético, colerético, etc (Butler et al., 2003).

Como reactivo reticulante bifuncional soluble en agua, la genipina reacciona rápidamente con aminas, con proteínas o con compuestos que presentan en su molécula grupos amino libres (Chiou et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que la genipina es un excelente agente de reticulación o *cross-linker* para gelatina, colágeno, quitosán y algunas enzimas (Bigi et al., 2002; Chun-Hsu et al., 2004; Jin et al., 2004; Cadorin Fernandes et al., 2013). Varios autores han reportado el potencial uso de la genipina, reemplazando al glutaraldehído en productos reticulados con aplicaciones biomédicas, tales como matrices para la liberación controlada de fármacos (Song et al., 2009), el diseño ingenieril de tejidos como cartílago articular (Lima et al., 2009; Yan et al., 2010) y en la fijación de tejidos (Sung et al., 2000). Además, este agente entrecruzador natural ha sido utilizado en el tratamiento de cueros de baja calidad como agente de relleno al actuar junto con la gelatina (Taylor et al., 2009), en la fabricación de colorantes para la industria de los alimentos (Fujiwaka et al., 1987), y en la medicina natural para el tratamiento de enfermedades tales como la diabetes, la hematuria, trastornos hepáticos y conjuntivitis (Chang & But, 1987). Estos estudios son alguno de los ejemplos que reportan que la genipina tiene significativamente menor citotoxicidad y mayor biocompatibilidad que el glutaraldehído, haciéndola atractiva para la inmovilización de enzimas.

En el presente capítulo se presenta una alternativa natural y menos tóxica para la inmovilización covalente de la enzima queratinasa.



## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

### **Materiales y métodos**

#### ***Reactivos químicos***

- Genipina, Challenge Bioproducts, Co. Mw: 226.23 g/mol, pureza: 98%
- Glutaraldehído Grado II G-6257 (25% en solución acuosa), Sigma Chemical Co.
- Chitosan, (porcentaje de desacetilación: 85%), Sigma Chemical Co.

#### ***Fuente de la enzima pura***

El sobrenadante de un cultivo de *P. lilacinum* cosechado al 5to día se sometió al proceso de purificación detallado en el capítulo “Queratinasa de *Purpureocillium lilacinum*: purificación y caracterización”. Solución stock de queratinasa pura: 3.06 U azoc/ml- 34.6U azoc/ml, 24 µg de prot/ml.

#### ***Preparación de esferas de quitosán***

Para la obtención de las esferas de quitosán primeramente se procedió a la preparación de una solución de quitosán al 3 % (p/v) en ácido láctico 0.25 M. Esta solución se agitó continuamente por un período de 1 h hasta disolución completa del quitosán y luego se sonicó durante 30 minutos para la eliminación del aire disuelto. Mediante el goteo de esta solución -con una jeringa de 5 mL con aguja de 0.70 mm de diámetro- sobre una solución de NaOH 2M con agitación continua, se obtuvieron las esferas de quitosán, las cuales se dejaron en contacto con la solución coagulante por un periodo de 1 h, luego se separaron y lavaron con agua destilada hasta obtener pH neutro. Estas esferas ( $2.17 \pm 0.22$  mm) se conservaron en Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) a 4 °C hasta el momento de su activación.

#### ***Activación de las esferas de quitosán***

Con el fin de seleccionar el mejor agente entrecruzador, la activación de las esferas de quitosán se realizó utilizando por un lado glutaraldehído y por el otro genipina. 2 g de esferas de quitosán se activaron incubándolas con distintas

### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

concentraciones de glutaraldehído (1.25 %, 2.5 %, 5 % v/v) durante toda la noche a 4 °C - 200 rpm. Por otra parte, la misma cantidad de esferas se activaron utilizando genipina como agente reticulante. Éstas se incubaron con distintas concentraciones de genipina (0.05 % y 0.150 % w/v), a distintas temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C), durante distintos tiempos (6 y 12 h) a 200 rpm. Luego de transcurrido el tiempo establecido para cada condición de activación, las esferas activadas se lavaron con agua destilada para eliminar el agente entrecruzante remanente y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Las soluciones de genipina se prepararon pesando la cantidad necesaria de ésta para preparar las diferentes soluciones, adicionando luego 1 ml de etanol y dejando reposar en oscuridad por 1 h. Transcurrido ese tiempo se llevó a volumen final con Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) y se continuó agitando en oscuridad por otros 60 minutos.

### ***Inmovilización de la queratinasa de *P. lilacinum****

La inmovilización de la enzima sobre las esferas activadas de quitosán se llevó a cabo incubando 40 esferas activadas de cada uno de los tratamientos anteriores ( $0.54 \pm 0.01$  g) con 4 ml de la enzima (0.30 U azoc/ml) a 4 °C - 200 rpm durante 12 h. Luego de transcurrido el tiempo de inmovilización, las esferas con la enzima inmovilizada se separaron del sobrenadante, el cual se guardó, y se lavaron 3 veces con Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) para remover la enzima que no fue inmovilizada y se conservaron a 4 °C hasta ser utilizadas. La misma concentración de enzima se incubó en ausencia de esferas para tener en cuenta la desnaturalización que pudo haber sufrido ésta durante la incubación y agitación. La actividad enzimática de los sobrenadantes así como de la enzima inmovilizada se determinó utilizando azocaseína como sustrato y siguiendo la técnica de medida detallada en el capítulo 2.

El porcentaje de enzima inmovilizada (EI%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$EI (\%): \frac{(U_0 - U)}{U_0} \times 100$$

### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

Donde  $U_0$  (U azoc/ml) son las unidades enzimáticas presentes en la solución utilizada en la inmovilización y  $U$  (U azoc/ml) son las unidades enzimáticas remanentes en el sobrenadante luego del proceso de inmovilización.

La capacidad de carga de las esferas activadas (*enzyme loading capacity*) (LC) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$LC: \frac{(U_0 - U)}{\text{gr de esferas}} \times 100$$

### ***Medida de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada***

La medida de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada se llevó a cabo tomando una cierta cantidad de esferas con la enzima inmovilizada e incubando las mismas con una solución de azocaseína (1 % p/v) a 37 °C durante una cierta cantidad de tiempo. El número de esferas (cantidad de enzima inmovilizada) así como el tiempo de incubación variaron de acuerdo a la experiencia realizada. Luego de transcurrido el tiempo fijado, la reacción se detuvo separando las esferas de la solución de azocaseína. A esta última se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA, 10 % p/v) y se continuó con la medida tal como se detalló en el capítulo 2. Los blancos de reacción se prepararon de la misma manera pero teniendo la precaución de agregar 1 ml de TCA antes del agregado de las esferas. Se define la unidad de actividad enzimática de la enzima inmovilizada (U azoc/g de soporte) como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.1 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto en las condiciones de reacción.

### ***Caracterización de la enzima inmovilizada***

Una vez seleccionado el mejor agente reticulante y la condición de activación bajo la cual se obtiene mayor porcentaje de enzima inmovilizada como así también mayor actividad enzimática por masa de esferas de quitosán, se procedió a caracterizar el sistema. La caracterización consistió en determinar las condiciones de medida de actividad en término de tiempo y concentración de enzima inmovilizada, en determinar la estabilidad al pH y temperatura, así como la reutilización de la enzima inmovilizada y

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

la estabilidad de la misma al almacenamiento, para luego realizar la comparación con la enzima libre.

### *1. Efecto del tiempo de incubación en la actividad de la enzima inmovilizada*

Para este estudio se procedió a incubar una cantidad de enzima fija en cada tubo de reacción (cantidad de esferas fijas: 2) equivalente a 0.03 g de esferas en presencia de una solución de azocaseína al 1 % (p/v) variando el tiempo de incubación. El tiempo de incubación varió entre 2 y 8 h. Luego de transcurrido este tiempo, se separó al catalizador, se agregó 1 ml de TCA (10 % p/v) y se continuó de la misma manera que se describió en el capítulo 2. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las experiencias y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

En esta experiencia se utilizó una fracción de queratinasa inmovilizada sobre esferas de quitosán activadas con glutaraldehído y otra fracción de queratinasa inmovilizada sobre esferas de quitosán activadas con genipina.

### *2. Efecto de la concentración de enzima inmovilizada (cantidad de enzima inmovilizada creciente) en la actividad enzimática*

Fijando un tiempo de incubación de 6 h frente al sustrato, se estudió el efecto de la cantidad de enzima inmovilizada sobre la medida de actividad para lo cual se fue aumentando (de 1 a 6) el número de esferas en el tubo de reacción. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, se separaron las esferas del sobrenadante y a este último se le agregó 1 ml de TCA (10 % p/v) y se continuó tal cual se describió en el capítulo 2. Las esferas fueron lavadas varias veces con Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) y guardadas a 4 °C para ser utilizadas en el estudio de reutilización de las mismas.

### *3. Efecto del pH en la estabilidad*

La estabilidad al pH de la enzima inmovilizada se estudió en un rango de 3.0 a 11.0, utilizando azocaseína como sustrato. Para el estudio de la estabilidad frente al pH, la enzima inmovilizada (0.057 g de esferas) se incubó frente a cada uno de los pHs dados durante 1 hora a 37 °C. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se separó la enzima inmovilizada del buffer de incubación y se determinó la actividad proteolítica residual en las condiciones de ensayo estándar.

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las condiciones y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

### *4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima inmovilizada*

El estudio de la estabilidad térmica se llevó a cabo incubando una determinada cantidad de enzima inmovilizada (0.057 g de esferas) en Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) en un rango de temperaturas de entre 20-60 °C durante 60 minutos (antes de comenzar a contar el tiempo de incubación, el sistema se incubó 5 minutos a cada temperatura para asegurar la homogeneidad térmica). Luego de transcurridos los 60 minutos, las muestras se colocaron en baño de agua-hielo, para luego determinar la actividad proteolítica residual en las condiciones de ensayo estándar. Los resultados se expresaron como la media de tres repeticiones  $\pm$  DS.

### *5. Estabilidad y reutilización de la enzima inmovilizada*

El ensayo de estabilidad durante el almacenamiento de la enzima inmovilizada se llevó a cabo manteniendo una determinada cantidad de la misma (0.54 g de esferas) en Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) a 4 °C durante 7 días. Una cantidad determinada de esferas (0.057 g) se utilizó cada día para la determinación de actividad proteolítica. La pérdida de actividad por almacenamiento se calculó como la actividad residual tomando como 100 % la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada a tiempo cero.

Por otra parte, se estudió la posibilidad de utilizar este sistema en ciclos repetidos de hidrólisis de azocaseína. Dado que se contaba con la serie de tubos -con concentración variable de enzima- que había sido utilizada en el estudio del efecto de la concentración de enzima inmovilizada sobre la actividad, se decidió continuar utilizando ese mismo sistema y someterlo a ciclos repetidos de hidrólisis. Se consideró como primer ciclo la experiencia del estudio del efecto de la concentración de la enzima. Luego, el ciclo de hidrólisis se repitió 4 veces más, es decir, la serie de tubos con enzima variables se sometió a 5 ciclos de hidrólisis en total. Luego de cada ciclo, las esferas se separaron y lavaron 3 veces con Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) para ser luego nuevamente introducidas en una solución fresca de azocaseína. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las condiciones y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos para la experiencia de *Activación de las esferas de quitosán* se analizaron mediante un análisis de varianza (*one way-ANOVA*) utilizando el test LSD para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el programa Statgraphics PLUS<sup>®</sup>. Los resultados se presentan como la media de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

## **Resultados y discusión**

### ***Inmovilización de la queratinasa de *P. lilacinum****

Los agentes reticulantes estudiados fueron glutaraldehído y genipina. Para el caso del glutaraldehído el único parámetro a optimizar fue la concentración del mismo a utilizar para la activación de las esferas (1.25 %, 2.5 %, 5 % v/v), en tanto que para la genipina se optimizó no sólo la concentración de la misma (0.05 % y 0.150 % w/v) sino que también se optimizó la temperatura de activación (30-50 °C). Para 30 °C, el tiempo de activación fue de 12 h, en tanto que para temperaturas superiores de 40 y 50 °C el tiempo de activación fue de 6 h. La elección de estos tiempos de activación está relacionada con el desarrollo de una coloración azul intensa sobre la superficie de las esferas de quitosán a medida que estas reaccionan con la genipina. Esta coloración azul que se desarrolla sobre la superficie de las mismas está relacionada con el fenómeno de reticulación de la genipina con los grupos aminos presentes en el quitosán (Butler et al., 2003). Luego de cumplido el tiempo de activación establecido a cada temperatura, se procedió a inmovilizar la enzima como se describió en materiales y métodos, para luego calcular el porcentaje de inmovilización. En la Tabla 1 se presentan los resultados de la experiencia de optimización para ambos agentes reticulantes.

Se puede observar que para el caso del glutaraldehído, el porcentaje de enzima inmovilizada fue mayor al 90 % en todos los casos. Siendo este porcentaje mayor a una menor concentración del mismo (1.25 % v/v). En cuanto al valor de la capacidad de carga de las esferas (LC), este parámetro no varió al variar la concentración de glutaraldehído, indicando que aún a bajas concentraciones del agente reticulante, éste provee la suficiente cantidad de grupos reactivos sobre la superficie de las esferas para la inmovilización casi el total de la enzima. Adriano et al. (2005) y Bhandari et al. (2009) entre tantos otros autores, estudiaron el efecto de la concentración del glutaraldehído en la inmovilización de una Penicill G acylase y una tiol-proteasa, respectivamente, encontrando resultados similares, donde el incremento en la concentración de glutaraldehído disminuía el porcentaje de inmovilización. Así, estos autores reportaron para Penicill G acylase una concentración óptima de glutaraldehído del 5 % y para la tiol proteasa de frijol una concentración óptima del 1 %. Por su parte,

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

Kilinc et al. (2002) reporta una concentración óptima del 2 % de este agente reticulante para la inmovilización de papaína, reportando todos ellos que un incremento en la concentración de glutaraldehído aumenta la fragilidad de las esferas de quitosán.

Tabla 1. Porcentaje de Enzima Inmovilizada (EI %) y capacidad de carga de las esferas activadas (*enzyme loading capacity*) (LC) para cada condición de estudio. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DS

Parámetros	EI (%)	LC
<i>Glutaraldehído (% v/v)</i>		
1.25	96.0 $\pm$ 0.6	26.5 $\pm$ 0.9
2.5	91.1 $\pm$ 0.8	26.6 $\pm$ 0.4
5.0	93.5 $\pm$ 0.4	27.5 $\pm$ 0.1
<i>Genipina (% p/v) (T: 30°C, TA: 12h )</i>		
0.05	63.5 $\pm$ 2,3	58.8 $\pm$ 0.2
0.150	92.8 $\pm$ 2.4	92.3 $\pm$ 1.7
<i>Genipina (% p/v) (T: 40°C, TA: 6h)</i>		
0.05	70.0 $\pm$ 1.6	62.4 $\pm$ 1.4
0.150	89.9 $\pm$ 1.4	82.4 $\pm$ 2.8
<i>Genipina (% p/v) (T: 50°C, TA: 6h)</i>		
0.05	56.1 $\pm$ 1.8	32.4 $\pm$ 1.5
0.150	70.0 $\pm$ 2.6	40.4 $\pm$ 1.3

Cuando la activación de las esferas de quitosán se realizó utilizando genipina como agente reticulante se observó que luego de un determinado período de tiempo - que depende de la temperatura a la cual se llevó a cabo la activación y de la concentración de genipina utilizada- las esferas cambiaron de color: comenzaron siendo blancas y al momento de finalizado el tiempo de activación quedaron azules oscuro, pasando por un color verdoso (Figura 7).



*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

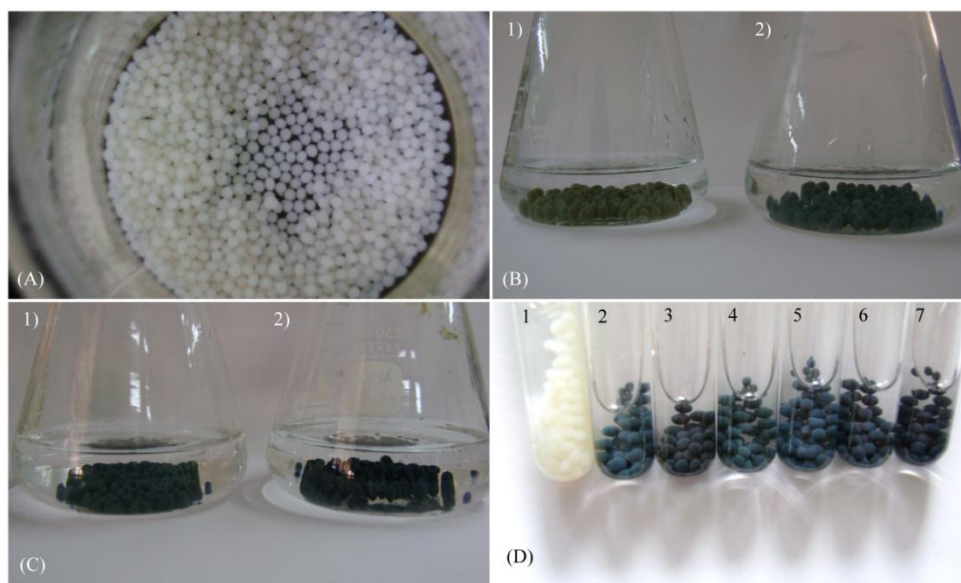


Figura 7 Apariencia de las esferas de quitosán activadas con genipina. A) Esferas de quitosán en ausencia de genipina. B) color desarrollado luego de 6 h de activación a dos concentraciones distintas de genipina (1- 0.05 % p/v y 2- 0.150 % p/v) a T: 30 °C. C) color desarrollado luego de 12 h de activación a dos concentraciones distintas de genipina (1- 0.05 % p/v y 2- 0.150 % p/v) a T: 30 °C. D) Colores desarrollados por cada una de las condiciones de activación estudiadas. 1-control; 2- y 3- 0.05 y 0.150 % p/v 12 h a T: 30 °C; 4- y 5- 0.05 y 0.150 % p/v 6 h a T: 40 °C; 6- y 7- 0.05 y 0.150 % p/v 6 h a T: 50 °C

Gonzalez et al. (2011) reportan este cambio de color en films de proteínas aisladas de soja reticuladas con genipina en tanto que Cadorin Fernandes et al. (2013) lo reportan para el entrecruzamiento con quitosán para el diseño de un biosensor enzimático, ambos autores coinciden de que el cambio de color es debido a la reacción química que se produce entre la genipina y los grupos amino libres de las proteínas o del quitosán. Contando con esta información es que se decidió tomar como punto final de la activación de las esferas de quitosán, el tiempo necesario para que éstas tomaran un color azul oscuro. Se observó una dependencia inversamente proporcional entre el tiempo de activación y la temperatura. A su vez se encontró que la intensidad de color es proporcional a la concentración de genipina utilizada. En otras palabras, el color de las esferas entrecruzadas con genipina dependió de la concentración de la misma, del tiempo que estuvieron las esferas en contacto con este agente entrecruzante y de la temperatura. Estas observaciones están en concordancia a las observaciones reportadas por Bi et al. (2011) y Zhang et al (2013).

### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

Observando los colores obtenidos en cada una de las condiciones estudiadas (Figura 7 d), se pensó que la mayor cantidad de enzima inmovilizada se obtendría en la condición de mayor concentración de genipina y mayor temperatura, sin embargo esto no fue así. Si bien en todos los casos el mayor porcentaje de inmovilización se obtuvo cuando se utilizó mayor concentración de genipina, éste disminuyó a medida que la temperatura se incrementó. Se obtuvo un 92.8 y un 89.9 % de inmovilización a 30 y 40 °C ( $p > 0.05$ ), respectivamente, cayendo a 70.0 % ( $p < 0.05$ ) cuando la temperatura de activación fue de 50 °C (Tabla1). El análisis estadístico demostró que no había diferencia significativa entre la condición de baja temperatura y largo tiempo (30 °C-12 h) y la condición de temperatura intermedia y corto tiempo (40 °C-6 h). Song et al. (2009) y Bi et al. (2011) estudiaron el efecto que ejercía la temperatura en el entrecruzamiento de hidrogeles de caseína y andamios de colágeno/quitosan con genipina, encontrando que ésta posee un efecto positivo. Con el aumento de la temperatura, el tiempo de gelificación disminuye y, para el caso de los soportes de colágeno/quitosan, el grado de reticulación de los mismos aumentaba al aumentar este parámetro. En nuestro caso, un aumento en la temperatura de activación no da como resultado un aumento en el porcentaje de inmovilización. Esto puede tener una explicación razonable si tenemos en cuenta el mecanismo de entrecruzamiento entre la genipina y el quitosán. Este mecanismo consta de dos reacciones consecutivas que tienen lugar en diferentes partes de la molécula de genipina. El primer paso es un ataque nucleofílico al C3 de la molécula de genipina por los grupos aminos presentes en el quitosán para formar una estructura intermedia con un grupo aldehído. La amina secundaria formada reacciona inmediatamente con este grupo aldehído y forma un heterociclo compuesto. El siguiente paso es una sustitución nucleofílica que implica la sustitución del grupo éster por un enlace amida secundaria. El paso final en el mecanismo de reticulación se cree que es por medio de radicales libres (Figura 8). El mecanismo por el cual las enzimas reaccionan con la genipina es por medio de la primera reacción.

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

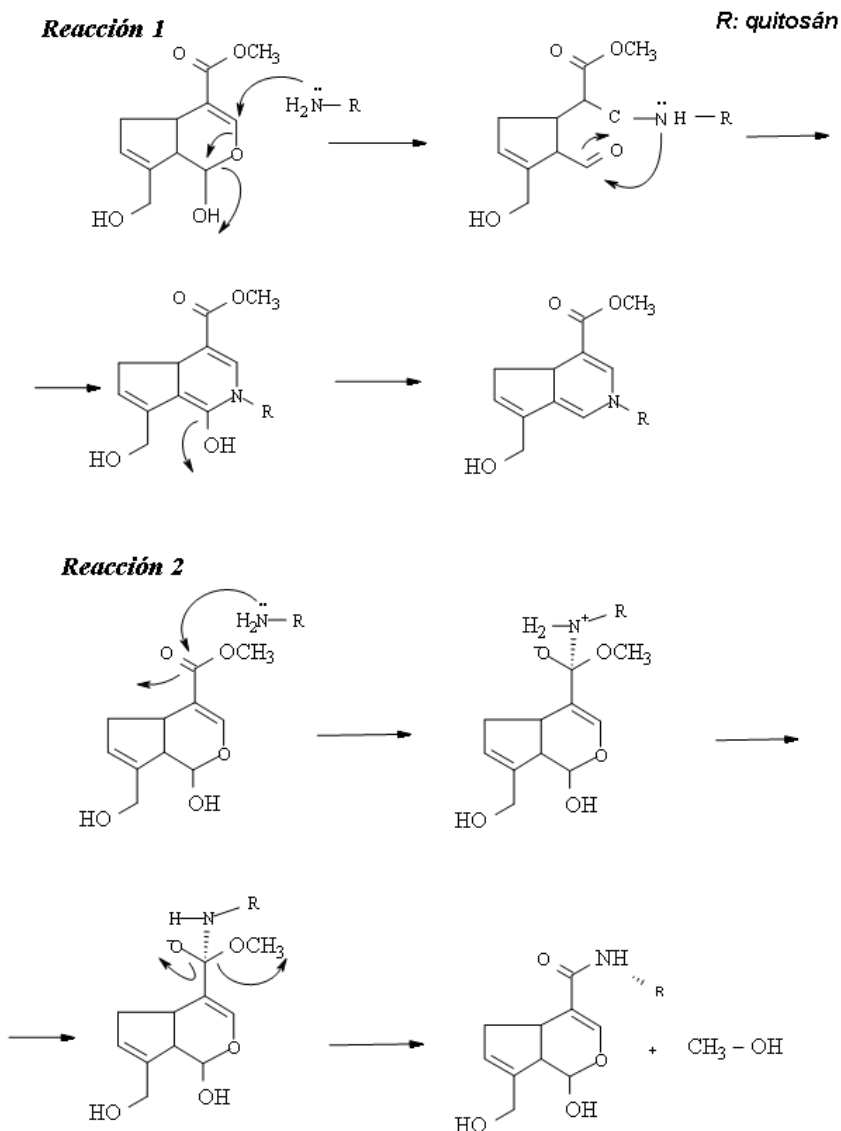


Figura 8. Reacciones de reticulación entre la genipina y el quitosán

Una reacción paralela que puede ocurrir es una primera polimerización entre las moléculas de genipina para formar puentes de agente entrecruzante (*cross-linking bridges*) antes de que ésta reaccione con el quitosán (Butler et al., 2003; Mi et al., 2005). El aumento de las temperatura, además de aumentar la velocidad de reacción de todas las reacciones de entrecruzamiento, también podría favorecer esta reacción de polimerización entre moléculas de genipina, dejando menos moléculas de genipina “libres” para reaccionar con la enzima a inmovilizar (Figura 9). Esta suposición tiene su

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

sustentación también al observar los valores de la capacidad de carga obtenidos en este caso, los cuales disminuyen al aumentar la temperatura, indicando que a una concentración fija de enzima hay menor cantidad de la misma inmovilizada por gramo de esferas. Esto no es así para el caso del glutaraldehído donde claramente se observa que tanto el porcentaje de inmovilización como la capacidad de carga son similares en todos los casos.

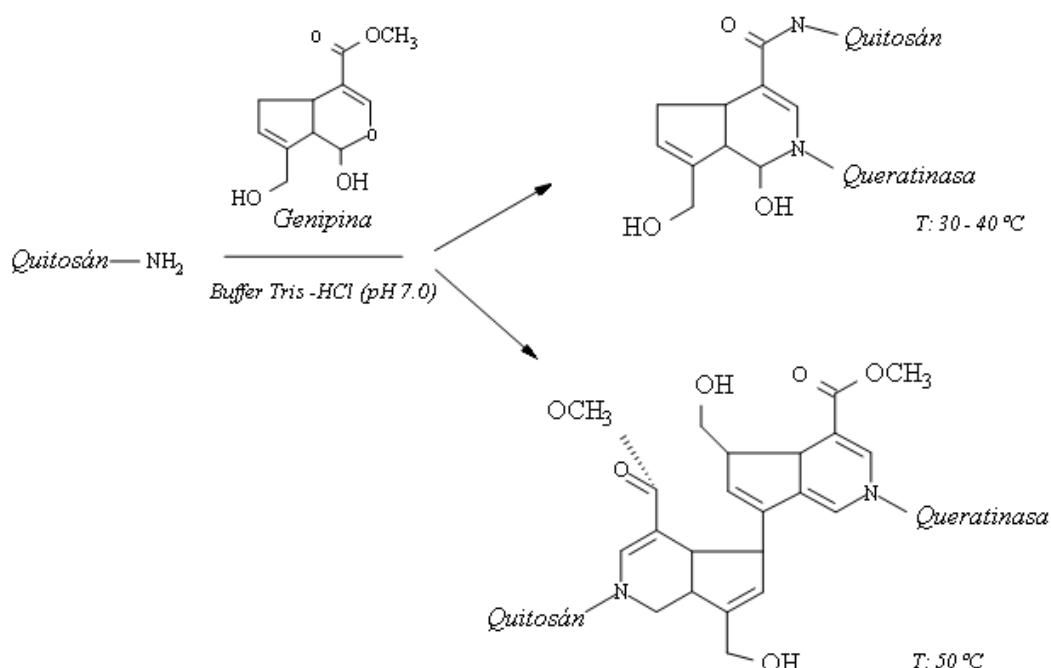


Figura 9. Esquema hipotético del modelo de entrecruzamiento entre la queratinasa de *P. lilacinum* con esferas de quitosán activadas con genipina

De los resultados anteriores, como primer paso en el estudio de de la inmovilización de la queratinasa, se seleccionaron las mejores condiciones de activación de las esferas de quitosán para cada agente reticulante estudiado. En el caso de glutaraldehído la mejor condición resultó ser la de menor concentración (1.25 % v/v) y para el caso de la genipina se optó por la condición que consumía menos tiempo y fue una condición de alta concentración de la misma (0.150 % p/v), temperatura de 40 °C y un tiempo de 6 h. Hasta el momento, la inmovilización de enzimas utilizando genipina no ha sido un tema muy estudiado, sólo 3 autores: Chiou & Hung (2007); Wang et al. (2011) y Cadorin Fernandes et al. (2013) han reportado el uso de este compuesto natural

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

para inmovilizar enzimas utilizando como soportes quitosán y resinas porosas. De ellos, sólo Wang et al. (2011) en su estudio de inmovilización de una Lipasa sobre resinas porosas como soporte compara el uso de estos dos agentes reticulantes, encontrando que con genipina los porcentajes de inmovilización eran mayores que con glutaraldehído.

### ***Caracterización de la enzima inmovilizada***

#### *1. Estudio de la linealidad*

Luego de seleccionar la mejor condición de activación de las esferas de quitosán en base al porcentaje de inmovilización de la enzima, se continuó trabajando con estos dos sistemas a fin de comparar cuál de ellos retenía mayor actividad enzimática, es decir, mayor cantidad de enzima activa en la superficie de las esferas de quitosán. Como la unidad de actividad enzimática tiene en cuenta el tiempo de reacción en su definición, para tener una imagen más clara en el efecto del tiempo en la actividad enzimática, en la Figura 10 se grafica el cambio de absorbancia en función del tiempo de incubación. Se observa que en ambos casos la formación del producto con respecto al tiempo sigue un comportamiento lineal en el rango de tiempo estudiado.

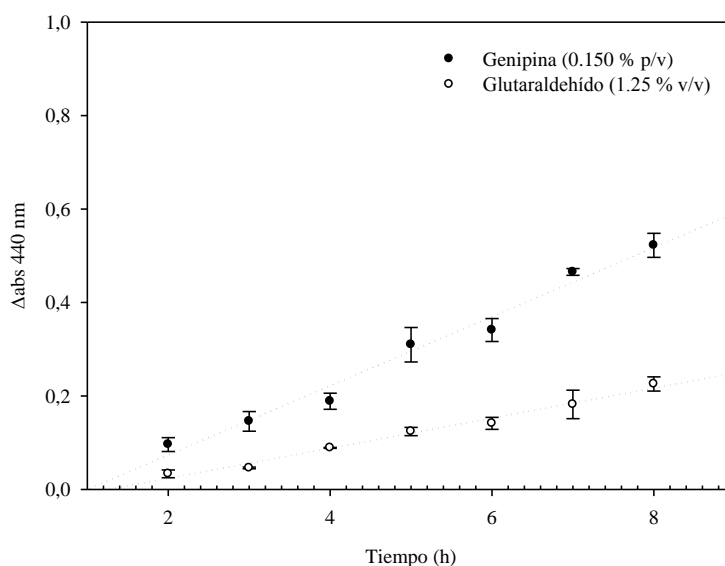


Figura 10. Efecto del tiempo de incubación en formación de producto a una cantidad de actividad enzimática fija (0.03 g de esferas)

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

Si bien el % de inmovilización obtenido fue mayor con glutaraldehído ( $96 \pm 0.6$  %), la actividad enzimática -la cual es proporcional a la pendiente de la recta- resultó ser menor que para el caso de la genipina, indicando que la enzima pierde parte de su actividad al unirse por entrecruzamiento con glutaraldehído. Estos resultados se encuentran en concordancia con los reportados por Moehlenbrock et al. (2010) quienes reportan al glutaraldehído como un agente reticulante más severo en comparación con el Dimetil Suberimidato en el proceso de reticulación de las enzimas del ciclo de Krebs dentro de la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*. Por su parte, Wang et al. (2011) en su estudio de inmovilización de una Lipasa de *Candida sp.* 99-125 sobre resinas porosas al comparar el uso de glutaraldehído y de genipina como agentes reticulantes obtienen resultados semejantes a los obtenidos en esta tesis.

### *2. Estudio del efecto del aumento de la cantidad de enzima inmovilizada*

Debido a los resultados obtenidos de esta segunda experiencia se decidió seleccionar a la genipina como agente entrecruzante y continuar con la caracterización sólo de este sistema. Dado que se contaba con el resultado previo que para una cantidad fija de enzima (0.03 g de esferas o en términos de actividad enzimática de 0.38 U/g), la actividad enzimática era lineal hasta al menos 8 h de incubación en presencia de sustrato, se decidió fijar un tiempo de medida de 6 h y estudiar el efecto de la cantidad de enzima en la medida de actividad. En términos de unidades enzimáticas, la cantidad de enzima agregada varió de  $5.1 \times 10^{-3}$  U a  $31 \times 10^{-3}$  U, lo que fue equivalente a aumentar el número de esferas en el tubo de reacción desde 1 hasta 6 (0.0135 - 0.081 g de esferas). La formación de producto a un tiempo de incubación fija de 6 h resultó ser lineal hasta una cantidad de enzima proporcional a 0.0154 U o en términos de masa de esferas a 0.04 g (3 esferas). Lo que significa que a mayores cantidades de enzima agregada la condición de velocidad inicial deja de tener validez y la absorbancia medida no es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la superficie de las esferas de quitosán (Figura 11).

En base a los resultados obtenidos se proponen condiciones de tiempo y cantidad de enzima para la medida de actividad enzimática, estando ahora la enzima inmovilizada sobre esferas de quitosán. Se plantea la posibilidad de utilizar un tiempo

### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

de reacción de 6 h con una cantidad de enzima proporcional a 0.0154 U o menor, a 37 °C en presencia de 0.250 µl de una solución de azocaseína al 1 % p/v. Por cuestiones de comodidad, se eligió un tiempo de incubación menor a 6 h (3 h), pero teniendo la precaución de aumentar la cantidad de enzima (0.026 U – 5 esferas).

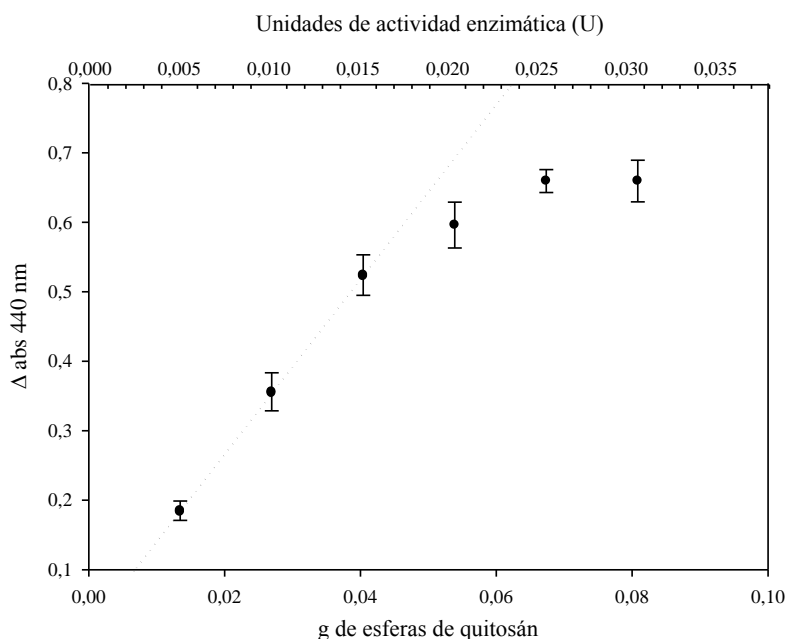


Figura 11. Formación de producto (medido con  $\Delta$  abs a 440 nm) a concentración de enzima crecientes (medida en términos de masa de esferas de quitosán o de U de actividad enzimática)

### *3. Efecto del pH en la estabilidad y la actividad de la enzima inmovilizada*

La inmovilización de enzimas se lleva a cabo, principalmente, para mejorar su estabilidad operacional y de almacenamiento. La estabilidad operacional puede evaluarse mediante la exposición de las enzimas inmovilizadas a diferentes condiciones de pH y temperatura. La estabilidad depende de la estructura de la enzima, del método de inmovilización, y la naturaleza del soporte. Las enzimas generalmente suelen desactivarse bajo una serie de condiciones tales como pH y temperaturas extremos. La estabilidad al pH de la queratinasa de *P. lilacinum* inmovilizada sobre esferas de quitosán utilizando genipina como agente reticulante se investigó en un rango de pH de 3.0 a 11.0 y se comparó con la estabilidad que presenta la enzima libre en ese mismo rango (capítulo 5). Se observó que en ambas condiciones la enzima presenta similar

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

estabilidad en el rango de pH comprendido entre 4.0 y 9.0, reteniendo el 100 % de la actividad luego de 1 h de incubación en todos los casos. Sin embargo, a pH 3.0 y a pH 10.0 la enzima inmovilizada presentó un incremento en su estabilidad pasando de 42 % de actividad residual a 70 % a pH 3.0 y de un 90 a un 100 % de actividad residual a pH 10.0, respectivamente. A pH 11.0 ambos sistemas presentaron una caída en la estabilidad, siendo menos drástica la pérdida en la enzima inmovilizada (Figura 12). Un incremento en la estabilidad a pHs más ácidos y básicos también ha sido reportado para la tiol-proteasa de poroto (Bhandari et al., 2009), la papaína (Kinlic et al., 2002) y para la tanasa (Abdel-Naby et al., 1999), todas enzimas que fueron inmovilizadas utilizando quitosán como soporte y glutaraldehído como agente reticulante. Para el caso de una lipasa tipo VII de *Candida rugosa* inmovilizada utilizando genipina como agente reticulante, se observó un aumento en estabilidad en el rango de pH entre 7-9. A pH menores y mayores, ambas lipasas disminuyeron su estabilidad (Chiou et al., 2007).

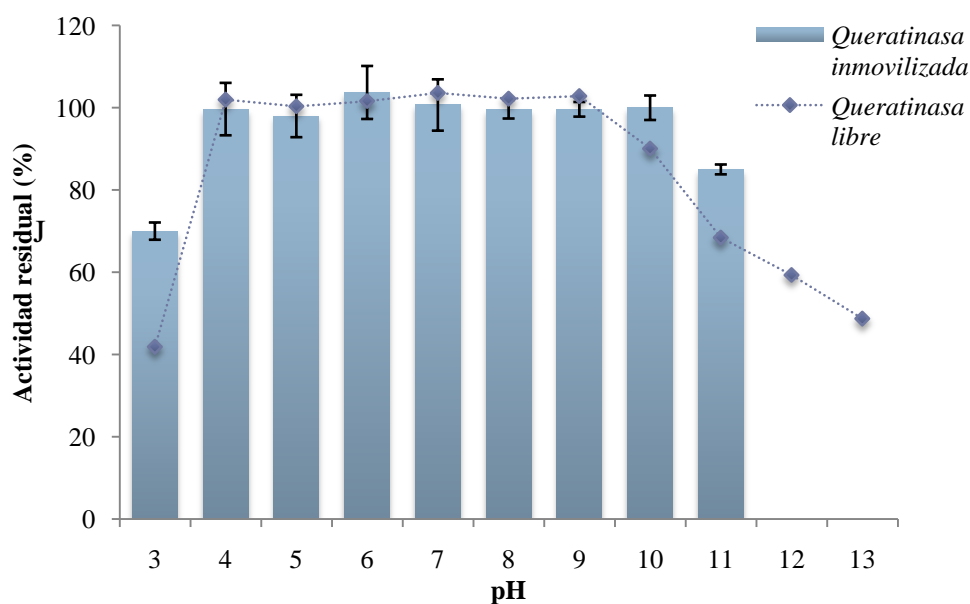


Figura 12. Estudio de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada. Luego de incubar ambos sistemas 1 h, se determinó la actividad residual a pH 9.0

A valores de pH ácidos, el quitosán se encuentra cargado positivamente, haciéndolo capaz de formar puentes salinos intramoleculares con los grupos aniónicos



### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

presentes en la proteína. Esta interacción electrostática podría ser responsable de la mejora en la estabilidad de la queratinasa a pH cercano a 3.0. De hecho, este tipo de interacción es una de las fuerzas principales que contribuyen al mantenimiento de la conformación activa de las enzimas (Kinlic et al., 2002).

#### *4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima inmovilizada*

La estabilidad térmica de la enzima inmovilizada se estudió incubando durante 60 minutos la enzima en un rango de temperaturas de 20-60 °C, para luego determinar su actividad residual. Se observa que la inmovilización de la enzima aumenta su estabilidad en comparación a la enzima libre. Por ejemplo, a 60 °C la enzima inmovilizada retiene un 35 % de actividad residual contra un 23 % de actividad que retiene en las mismas condiciones la enzima libre (Figura 13).

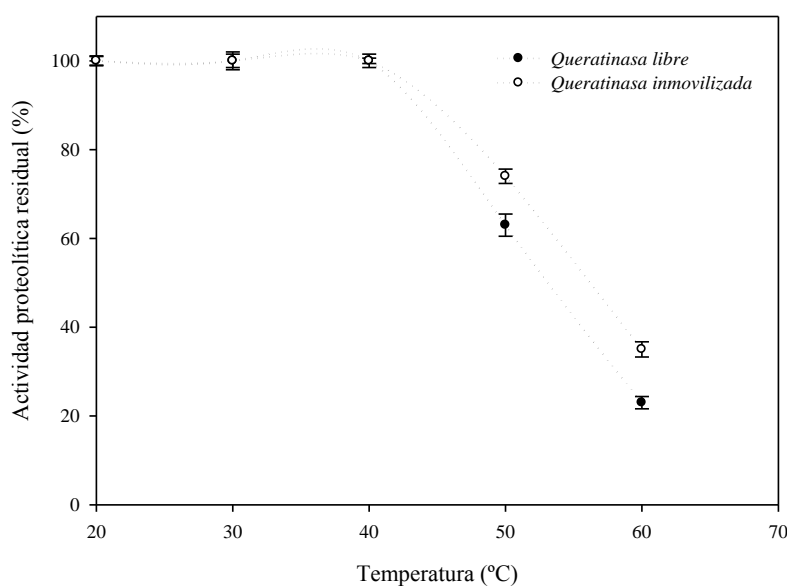


Figura 13. Estabilidad térmica de la enzima libre (●) y la enzima inmovilizada (○)

Este aumento en la estabilidad térmica ha sido reportado por varios autores para una gran cantidad de enzimas inmovilizadas sobre distintos tipos de soportes (Chae et al., 1998; Farag & Hassan, 2004). Chiou & Hung (2007) y Wang et al. (2011), en estudios de inmovilización de lipasas utilizando genipina como agente entrecruzante, atribuyen

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

este aumento de estabilidad a que la reticulación haría que la enzima inmovilizada tenga una conformación más rígida lo cual evitaría la deformación por stretching.

*Estabilidad y reutilización de la enzima inmovilizada*

A fin de estudiar la reutilización de la enzima para la hidrólisis de azocaseína, se utilizó una serie de tubos donde se varió la cantidad de esferas en los mismos de 0.01 a 0.04 g y se los sometió a 5 ciclos de hidrólisis (de seis horas cada uno). Luego de cada ciclo, las esferas se separaron y se lavaron 3 veces con Buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 7.0) para ser luego nuevamente introducidas en una solución fresca de sustrato. Se consideró el 100 % de actividad aquella que se obtuvo en el primer ciclo de hidrólisis.

Se observa en la Figura 14 que a medida que se somete a la enzima a los distintos ciclos de hidrólisis, ésta va perdiendo su capacidad catalítica. Luego del segundo ciclo de hidrólisis, la actividad residual resulta ser un  $93.3 \pm 2.3$  %, para finalizar en un  $61.2 \pm 2.5$ , luego de 5 ciclos de hidrólisis.

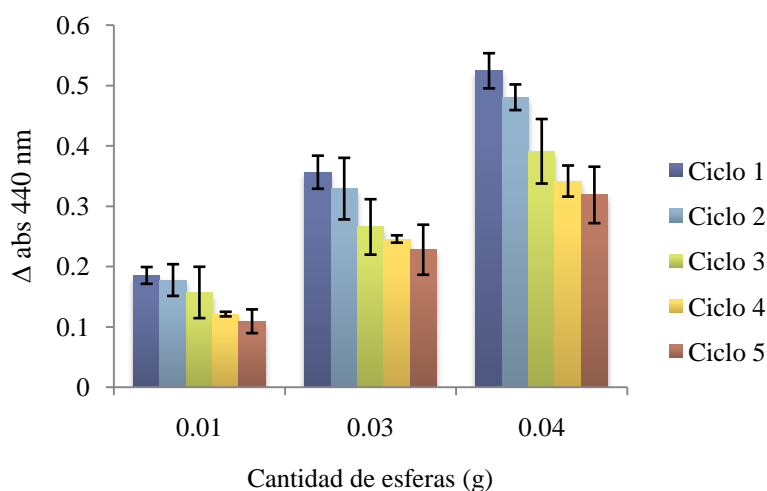


Figura 14. Estudio de la reutilización de la queratinasa inmovilizada sobre esferas de quitosán. La enzima fue sometida a 5 ciclos de hidrólisis de azocaseína a 37 °C

La pérdida en la actividad enzimática en este tipo de sistemas se suele atribuir a que el uso repetido de estas enzimas suele debilitar los enlaces presentes entre el soporte y la enzima, reduciendo la capacidad catalítica de las mismas (Spinelli et al., 2013). Silveira et al. (2012) reportan una caída del 36.6 % en la actividad de una metalo-

### *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

proteasa con actividad queratinolítica de *Chryseobacterium sp* (inmovilizada en esferas de quitosán activada con glutaraldehído) luego de que fuera sometida a 5 ciclos de hidrólisis. Kannan & Jasra (2009) reportan una capacidad de reuso de hasta 15 ciclos, luego de los cuales, la endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* retiene cerca del 80 % de su actividad residual cuando ésta se encuentra inmovilizada sobre soportes como SBA-15 y MCF utilizando glutaraldehído como agente reticulante. Para el caso de genipina, Chiou & Hung (2007) y Wang et al. (2011) reportan una pérdida de actividad del 39.6 y del 26 % respectivamente, luego de haber sometido a ambos sistemas a 6 y 5 ciclos de hidrólisis.

Además de la capacidad de reutilización del biocatalizador, un factor importante en la evaluación de la eficacia de la enzima inmovilizada es la estabilidad que presenta la misma al almacenamiento. Generalmente una enzima libre suele perder gradualmente su actividad a medida que pasa en tiempo, tal como se observa para la enzima lacasa de *Trametes versicolor* luego de 7 días de almacenamiento a 4 °C (Spinelli et al., 2013) o para la enzima lipasa de *Candida sp.* 99-125 (Wang et al., 2011) luego de 25 días de almacenamiento a la misma temperatura. En nuestro caso, se observó que la queratinasa libre sufrió una pequeña disminución en su actividad a lo largo de los 7 días de almacenamiento a 4 °C. Tanto la enzima libre como la inmovilizada presentaron una alta estabilidad en el tiempo. Al cabo de 7 días, la enzima libre retuvo un 94 % de su actividad inicial, en tanto que la enzima inmovilizada retuvo un 97.4 % de su actividad inicial, respectivamente.

## Conclusiones

El uso de compuestos químicos como glutaraldehído, 3,5-difluoronitrobenzeno, etilendimetacrilato, metilglioxal, etc. han sido extensamente utilizados como agentes reticulantes para la inmovilización de enzimas, hecho que no ocurre para el caso de la genipina -agente reticulante natural- el cual ha sido extensamente utilizado para el desarrollo de materiales biomédicos pero no así para la inmovilización de enzimas. En el estudio de la inmovilización de la enzima queratinasa de *P. lilacinum* sobre esferas de quitosán se estudió la posibilidad de reemplazar el agente reticulante de enzimas por excelencia: el glutaraldehído por una alternativa menos toxica como la genipina.

Se optimizaron las condiciones de activación del soporte a fin de obtener el mayor porcentaje de inmovilización enzimática para cada caso. Las mejores condiciones de activación resultaron ser para el caso del glutaraldehído una concentración de 1.25 % v/v con un tiempo de activación de 12 h y para la genipina una concentración de 0.150 % p/v, a temperatura de 40 °C y un tiempo de 6 h. En estas condiciones, el 96% de la enzima fue inmovilizada cuando se utilizó glutaraldehído y el 90 % cuando se utilizó genipina. Sin embargo, se demostró que a pesar de haber obtenido mayor porcentaje de inmovilización utilizando glutaraldehído, la actividad recuperada fue mayor para el caso de la genipina, demostrando el efecto tóxico que tiene el glutaraldehído sobre la actividad enzimática, sustentando el uso de la genipina como agente natural para la inmovilización de enzimas.

La enzima inmovilizada utilizando genipina como agente reticulante demostró tener mayor estabilidad frente a pH extremos y mayor estabilidad a la temperatura que la que presentaba la enzima libre en solución. Tanto la enzima libre como la enzima inmovilizada resultaron ser estables durante los 7 días de almacenamiento a 4 °C, siendo la capacidad de reuso en ciclos de hidrólisis lo que resulta ser atractivo del sistema desarrollado

## *Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

### **Bibliografía**

- Abdel-Naby, M.A., Sherif, A.A., El-Tanash, A.B., and Mankarios, A.T. (1999) Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme. *Journal of Applied Microbiology* 87:108- 114
- Adriano, W.S., Filho, H.C., Silva, J.A., Giordano, R.L., and Gonçalves, L.R. (2005) Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22:529- 538
- Arroyo, M. (1998) Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 39:23- 39
- Bahar, T. & Tuncel, A. (2001) Immobilization of invertase onto crosslinked poly(p-chloromethylstyrene) beads. *Journal of Applied Polymer Science* 83:1268- 1279
- Bhandari, S., Gupta Kumar, V., and Singh, H. (2009) Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Biocatalysis and Biotransformation* 27:71- 77
- Bi, L., Cao, Z., Hu, Y., Yang, Y., Song, Y., Yu, L., Yang, B., Mu, J., and Huang, Z. (2011) Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Material Science* 22:51- 62
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., and Rubini, K. (2002) Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23:4827- 4832
- Brahim, S., Narinesingh, D., and Guiseppi-Elie, A. (2002) Kinetics of glucose oxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18:69- 80
- Brena BM and Batista-Viera F (2006) Immobilization of enzymes. In: *Immobilization of enzymes and cells*, Guisan JM (ed) Second edition. Humana Press, New Jersey, pp 15-30
- Burge, P.S. (1989) Occupational risks of glutaraldehyde. *British Medical Journal* 299:342- 343
- Butler, M.F., Yiu-Fai, N.G., and Pudney, P.D. (2003) Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 41:3941- 3953
- Cadorin Fernandes, S., Santos, D.M., and Cruz Vieira, I. (2013) Genipin-cross-linked chitosan as a support for laccase biosensor. *Electroanalysis* 25:557- 566
- Chae, H.J., In, M.J., and Kim, E.Y. (1998) Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 73:195- 204
- Chang, H.M. & But, P.P.H. (1987) Pharmacology and applications of chinese materia. *Medica* 2:1005- 1006

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

- Chiou, S., Hung, T., Giridhar, R., and Wu, W. (2007) Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 37:265- 275
- Chun-Hsu, Y., Bai-Shuan, L., Chen-Jung, C., Shan-Hui, H., and Yueh-Sheng, C. (2004) Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics* 83:204- 208
- De-Sheng, J., Long, S.Y., Huang, J., Xiao, H.Y., and Zhou, J.Y. (2005) Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* 25:15- 23
- Dumitriu S, Vidal P, and Chornet E (1997) Enzyme Immobilization Using Chitosan-Xanthan Complexes. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Bickerstaff G (ed) 1. Humana Press, 229-236
- Farag, A.M. & Hassan, M.A. (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34:85- 93
- Fujiwaka, S., Fukui, Y., Koga, K., and Kumada, J.I. (1987) Brilliant skyblue pigment formation from Gardenia fruits. *Journal of Fermentation Technology* 65:419- 424
- Goncalo, S., Brandao, M.F., Pecegueiro, M., Moreno, J.A., and Sousa, I. (1984) Occupational contact dermatitis to glutaraldehyde. *Contact Dermatitis* 10:183- 184
- Gonzalez, A., Strumia, M.C., and Alvarez Igarzabal, C.I. (2011) Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106:331- 338
- Guisan, J.M. (1987) Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Enzyme and Microbial Technology* 10:375- 382
- Gupta M and Mattiasson B (1992) Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. In: *Methods of Biochemical Analysis*, Suelter CH (ed) Wiley, New York, pp 1-34
- Hudson SM and Smith C (1998) Polysaccharides: chitin and chitosan: chemistry and technology of their use as structural materials. In: *Biopolymers from renewable resources*, Kaplan DL (ed) Springer, Berlin, pp 96-118
- Illanes, A. & Wilson, L. (2003) Enzyme reactor design under thermal inactivation. *Critical Reviews in Biotechnology* 23:61- 93
- Jin, J., Song, M., and Hourston, D.J. (2004) Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules* 5:162- 168
- Kannan, K. & Jasra, R.V. (2009) Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56:34- 40
- Khor, E. (2002) Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 6:317-

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

- Kinlic, A., Onal, S., and Telefoncu, A. (2002) Estabilization of papain by modification with chitosan. *Turkish Journal of Chemistry* 26:311- 316
- Koilpillai, L., Gadre, R.A., Bhatnagar, S., Raman, R.C., Ponrathnam, S., Kumar, K.K., Ambekar, G.R., and Shewale, J.G. (1990) Immobilization of penicillin G acylase on methacrylate polymers. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 49:173-182
- Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan- based material for enzyme immobilization: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35:126- 139
- Li, B., Chen, Y., Chen, X., Liu, D., Niu, H., Xiong, J., Wu, J., Xie, J., Bai, J., and Ying, H. (2012) A novel immobilization method for nuclease P<sub>1</sub> on macroporous absorbent resin with glutaraldehyde cross-linking and determination of its properties. *Process Biochemistry* 47:665- 670
- Lima, E.G., Tan , A.R., Tai, T., Marra, K.G., DeFail, A., Ateshian, G.A., and Hung, C.T. (2009) Genipin enhances the mechanical properties of tissue engineered cartilage and protects against inflammatory degradation when used as a medium supplement. *Journal of Biomedical Materials Research* 91:692- 700
- Mi, F.L., Shyu, S.S., and Peng, C.K. (2005) Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 43:1985- 2000
- Moehlenbrock, M.J., Toby, T.K., Waheed, A., and Minteer, S.D. (2010) Metabolon Catalyzed Pyruvate/Air Biofuel Cell. *Journal of the American Chemical Society* 132:6288- 6289
- Quirce, S., Gomez, M.M., Bombin, C., and Sastre, J. (1999) Glutaraldehyde-induced asthma. *Allergy* 54:1121- 1122
- Robertson, D.E. & Steer, B.A. (2004) Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Current Opinion in Chemical Biology* 8:141- 149
- Rokugawa, K., Fujishima, T., Kuninaka, A., and Yoshino, H. (1980) Immobilization of nuclease P<sub>1</sub> on inorganic support by titanium complex method: studies on immobilized enzyme (III). *Journal of Fermentation Technology* 58:509- 515
- Sedaghat, M.E., Ghiaci, M., Aghaei, H., and Soleimani-Zad, S. (2009) Enzyme immobilization. Part 4. Immobilization of alkaline phosphatase on Na-sepiolite and modified sepiolite. *Applied Clay Science* 46:135-
- Silveira, S.T., Gemelli, S., Segalin, J., and Brandelli, A. (2012) Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:818- 825
- Song, F., Zhang, L.M., Yang, C., and Yan, L. (2009) Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 373:41- 47
- Spinelli, D., Fatarella, E., Di Michele, A., and Pogni, R. (2013) Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. *Process Biochemistry* 48:218- 223

*Inmovilización de la enzima sobre esferas de quitosán*

- Sung, H.W., Chang, Y., Liang, I.L., and Chang, W.H. (2000) Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: Fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. *Journal of Biomedical Materials Research* 52:77- 87
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A., Haik, Y., and Farid, M. (2011) A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. *Enzyme Research* 2011:1- 25
- Taylor, M.M., Bumanlag, L.P., Marnier, W.N., and Brow, E.M. (2009) Potential application for genipin-modified gelatin in leather processing. *Journal of American Leather Chemists Association* 104:79- 91
- Tischer, W. & Wedekind, F. (1999) Immobilized enzymes: methods and applications. *Topics in Current Chemistry* 200:95- 126
- Van der Burg, B. & Eijssink, V.G. (2002) Selection of mutations for increased protein stability. *Current Opinion in Chemical Biology* 13:333- 337
- Wang, W., Jiang, Y., Zhou, L., and Gao, J. (2011) Comparison of the Properties of Lipase Immobilized onto Mesoporous Resins by Different Methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164:561- 572
- Wu, L., Yuan, X., and Sheng, J. (2005) Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science* 1-2:167- 173
- Xia, K.S., Ismail, S.A., and Dessouki, A.M. (2003) Immobilization of  $\beta$ -amylase using polyacrilamide polymer derivatives. *J Chem Technol Biotechnol* 78:891- 898
- Yan, L.P., Wang, Y.J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S.G., Fan, J.B., Wang, L.Y., Ji, P.H., Oliveira, J.M., Mano, J., and Reis, R.L. (2010) Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95:465- 475
- Zhang, Q., Dong, P., Chen, L., Wang, X., and Lu, S. (2013) Genipin-cross-linked thermosensitive silk sericin/poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels for cell proliferation and rapid detachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* :000- 000
- Zhou, Q.Z. & Chen, X.D. (2001) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *Journal Food Engineering* 48:69- 74



# Capítulo 8

*Aplicaciones biotecnológicas del extracto enzimático  
obtenido de la degradación del residuo pelo por  
Purpureocillum lilacinum LPS#876*



## *Evaluación del extracto enzimático en la formulación de detergentes comerciales*

### **Resumen**

Las proteasas microbianas constituyen uno de los grupos más importantes dentro de las enzimas industriales y poseen su campo de acción principalmente en la industria de los alimentos, del cuero y de los detergentes. En los últimos 30 años, la importancia de las proteasas en los detergentes ha ido cambiando: pasaron de ser aditivos menores a ser los principales ingredientes. En este capítulo se presenta la evaluación del extracto enzimático de *Purpureocillium lilacinum* en la formulación de detergentes comerciales. Se estudió la estabilidad del mismo frente a agentes oxidantes ( $H_2O_2$  y perborato de sodio) y su compatibilidad con detergentes comerciales como Ariel, Drive, Skip y Ace. En presencia de detergentes sólidos, el extracto enzimático retuvo más del 80 % de su actividad inicial luego de haber sido incubado 1 hora a 30 °C con cada uno de ellos, en tanto que al aumentar la temperatura a 40 y a 50 °C este porcentaje disminuye a un 70 y un 60 %, respectivamente. En presencia de detergentes líquidos, el extracto enzimático retiene más del 70 % de su actividad inicial luego de 1 h a 50 °C con Ariel líquido y más de un 55 % con Ace líquido. Así mismo, cuando el extracto enzimático se incubó con Mr Músculo pre- lavado se observó que a 30 y 40 °C retuvo el 100 % de la actividad inicial, en tanto que a 50 °C retuvo un 80 % de la actividad inicial. También se evaluó la capacidad del extracto enzimático de remover manchas de sangre, demostrando que es capaz de remover éstas manchas tan bien como un detergente comercial.

## Introducción

Las proteasas microbianas constituyen uno de los 3 grupos más importantes dentro de las enzimas industriales, ocupando una posición primaria en el campo comercial. Desde el punto de vista económico la producción de enzimas industriales en el 2011 generó ganancias por alrededor de 1700-2000 millones de dólares (manteniendo su tendencia de participación en el mercado hasta nuestros días), el 75 % de las ventas se debe a enzimas hidrolíticas, de las cuales 60 % corresponde a la venta de proteasas (Shankar et al., 2011). Este porcentaje tan grande de ventas se debe a que las proteasas son utilizadas en una gran variedad de industrias tales como la industria de los alimentos, de los detergentes, en la industria farmacéutica así como en industrias textiles y en la recuperación de metales pesados a partir de desechos industriales (Savitha et al., 2011). La industria biotecnológica Novozymes es una de las más importantes a nivel mundial y abarca el 47 % del mercado de las enzimas. Está dividida en tres áreas: enzimas para uso industrial, microorganismos, e ingredientes para la industria biofarmacéutica, representando cada área un 90 %, 8 % y 1 % de las ventas, respectivamente. Dentro de este 90 %, un 34 % corresponde a enzimas deterativas (enzimas utilizadas en detergentes de lavandería y máquinas lavavajillas) mientras que un 28 % corresponde a enzimas que se emplean para mejorar la calidad de los alimentos (enzimas relacionadas con la panificación, con la producción de bebidas alcohólicas, zumos de fruta, etc.; enzimas para ser aplicadas en la industria de los productos lácteos y en la industria de aceites y grasas) (Figura 1).

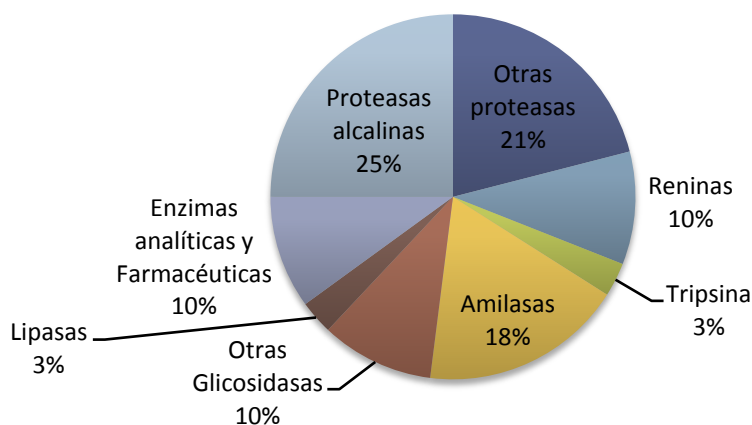


Figura 1. A) Distribución de la venta mundial de enzimas para el año 2011

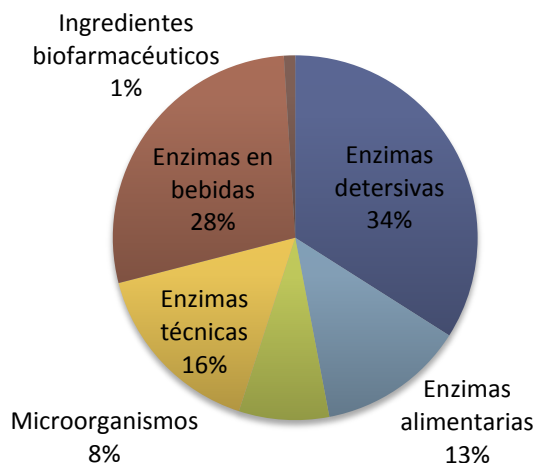


Figura 1.B) Porcentaje de ventas de los productos en el año 2012 por la empresa Novozymes

Claramente se observa que hasta hoy uno de los pilares del mercado de las enzimas son las enzimas detergentivas, aquellas proteasas alcalinas utilizadas en las formulaciones de los detergentes llamados “Green-Chemicals” (nombre que denota la naturaleza *eco-friendly* de los mismos). Estos detergentes enzimáticos son preferidos a los detergentes sintéticos por la capacidad de limpieza que tienen, por su capacidad de actuar a bajas temperaturas, y por el bajo contenido de fosfatos que poseen estas formulaciones (Nielsen et al., 1981). Todas las proteasas alcalinas utilizadas en la industria de los detergentes son subtilisin proteasas de distintas especies del género *Bacillus*.

Fue en 1913 cuando el químico alemán Röhm Otto patentó el uso de enzimas pancreáticas en la formulación de detergentes, el nombre comercial de este producto fue “Burnus” y consistía en una mezcla de carbonato de sodio con un extracto crudo de enzimas pancreáticas. Se lo considera como la persona que revolucionó la industria de los detergentes (Barfoed, 1981). En 1957 aparece en el mercado el primer detergente comercial con proteasas bacterianas bajo el nombre de Bio-40, y es a mediados de los años 60`s donde hacen su aparición varios detergentes enzimáticos de la mano de las empresas biotecnológicas Novo y Gist-Brocades. Novo Industries introduce la proteasa alcalina producida por *Bacillus licheniformis* Alcalase bajo en nombre comercial de

## *Evaluación como aditivo de detergentes*

BIOTEX (Rao et al., 1998), y Gist-Brocades introduce la proteasa alcalina Maxatase (Antrim et al., 2004).

A comienzos de los años 70`s la industria pujante de los detergentes sufre un serio retroceso cuando tanto los trabajadores como las personas en general comienzan a desarrollar severas alergias debido al polvo presente en estos detergentes. Este problema se resolvió desarrollando formulados libres de polvos y tecnologías de encapsulamiento o granulación para las enzimas (Barfoed, 1981). Para mediados de los años 80`s las subtilisin proteasas demuestran ser un excelente modelo para ensayos de ingeniería genética y es a final de esta década cuando comienzan a ser producidas usando microorganismos recombinantes para entrar al mercado en los años 90`s (Maurer, 2004).

El buen desempeño de las proteasas en los detergentes depende de varios factores que incluyen el pH del detergente, la fuerza iónica, temperatura de lavado, la composición de los detergentes (perfumes, colorantes, compuestos blanqueadores, etc.), procedimiento de lavado y la dureza del agua de lavado. En otras palabras, una proteasa candidata a ser utilizada como aditivo en detergentes debe cumplir con ciertos requisitos entre los que se encuentran: ser compatible y estable frente a los compuestos comúnmente presentes en los detergentes como surfactantes, agentes blanqueadores, perfumes, agentes secuestrantes; ser activa y estable a pH alcalinos; poseer buena estabilidad a altas temperaturas así como también poseer una amplia especificidad de sustrato para poder remover una gran variedad de manchas y ser activa aún en bajas concentraciones, ya que normalmente la concentración de una enzima en un detergente comercial ronda el 0.4-0.8 % p/p (Haddar et al., 2010).

A pesar de que han pasado 50 años desde que el comienzo del uso de proteasas microbianas como ingredientes en los detergentes, esta industria está en constante búsqueda de nuevas enzimas capaces de mejorar el rendimiento del lavado - especialmente a bajas temperaturas - y capaces de resistir los agentes blanqueadores presentes en los formulados, entre otros.

El extracto enzimático producido por *P. lilacinum* demostró poseer una gran estabilidad frente a un amplio rango de pHs y temperaturas, reteniendo más del 60 % de su actividad inicial luego de 2 h de incubación a pH 11 y 45 °C y ser estable frente a surfactantes iónicos y no-iónicos como SDS, Tritón X-100 y Tween 20. Todas estas

### *Evaluación como aditivo de detergentes*

características motivaron investigar el potencial uso de este extracto enzimático como aditivo para detergentes. Así, se estudió la compatibilidad del mismo con detergentes comerciales, la estabilidad frente a agentes blanqueadores así como también la capacidad de remover manchas de sangre presentes en telas de algodón.

## **Materiales y métodos**

### ***Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica***

Para este estudio se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 cosechado al 5<sup>to</sup> día de cultivo con 10 g/l de residuo pelo como sustrato queratínico convenientemente diluido para trabajar a las concentraciones necesarias (6.9 U azoc/ml).

### ***Medida de la actividad proteolítica***

La medida de actividad residual del extracto enzimático se llevó a cabo mediante la determinación de la actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato. La técnica de medida se detalla en el capítulo 2.

### ***Medida de la compatibilidad del extracto enzimático con detergentes comerciales***

En esta experiencia se utilizaron detergentes comerciales líquidos y sólidos. Dentro de los detergentes sólidos se evaluó la compatibilidad frente a Ariel y Ace (Procter & Gamble®), Drive y Skip (Unilever®) y dentro de los detergentes líquidos: Ace y Ariel (Procter & Gamble®), asimismo se probó la compatibilidad frente a un líquido pre-lavado Mr Músculo (SC Johnson & Son®). Los detergentes sólidos se diluyeron en agua corriente en una concentración final de 7 mg/ml y tanto los detergentes líquidos como el líquido pre-lavado se diluyeron 100 veces, con el fin de simular las condiciones normales de lavado (Haddar et al., 2010). Las enzimas propias de cada detergente fueron inactivadas por calor, incubando las diluciones de los detergentes a 65 °C por 1 h (Sellami-Kamoun et al., 2008). Una vez enfriadas estas soluciones se agregó el extracto enzimático a cada uno de los detergentes y se incubó durante 1 h en un rango de temperaturas que fue desde los 30 a los 50 °C. Determinándose luego el porcentaje de actividad residual (%) tomando como 100 % un control incubado en las mismas condiciones pero sin el agregado de detergentes. A cada temperatura se realizó un control de inactivación térmica, para asegurar que la caída en el porcentaje de actividad enzimática se deba puramente a la naturaleza del detergente estudiado y no a una pérdida



### *Evaluación como aditivo de detergentes*

de actividad por inactivación térmica. Es importante señalar que el extracto enzimático se encontraba lo suficientemente concentrado como para no alterar la concentración final del detergente.

### ***Efecto de agentes blanqueadores sobre la estabilidad enzimática***

El efecto de agentes blanqueadores tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y perborato de sodio en la estabilidad del extracto enzimático se determinó incubando el extracto crudo con varias concentraciones de cada uno de ellos. Para el caso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el rango de concentraciones ensayadas varió entre 1 a 3 % p/v y entre 0.2 y 1.0 % p/p para perborato de sodio. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente (25 °C) se determinó el porcentaje de actividad residual (%) tomando el 100 % al extracto enzimático sin el agregado de agente blanqueador.

### ***Evaluación de la eficacia de lavado***

Sobre piezas de telas de algodón de 2.5 x 2.5 cm se realizó una mancha con 100 µl de sangre que se dejaron secar al aire por 24 h. Las piezas sucias fueron luego sometidas a una serie de ciclos de lavado en erlenmeyers de 100 ml:

- a) 50 ml de agua corriente + pieza de algodón con sangre
- b) 50 ml del detergente Skip (7 mg/ml) + pieza de algodón con sangre
- c) 50 ml del detergente Skip (7 mg/ml) inactivado térmicamente + extracto enzimático (62.5 U azoc totales) + pieza de algodón con sangre

En cada uno de los erlenmeyers se colocaron 2 piezas de algodón con sangre y una serie de cada condición se incubó a 30 °C en tanto que otra serie se incubó a 40 °C bajo agitación constante (200 rpm). Luego de 30 minutos, se retiró de cada erlenmenyer una de las piezas de algodón, la cual se enjuagó con agua corriente y se dejó secar, el mismo procedimiento se llevó a cabo luego de cumplidos los 60 minutos de lavado. La evaluación de la eficacia de lavado del extracto enzimático se llevó a cabo visualmente (Hmidet et al., 2009).

## *Evaluación como aditivo de detergentes*

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos en cada experiencia se analizaron mediante un análisis de varianza (*one way*-ANOVA) utilizando el test de LSD para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el programa Statgraphics PLUS<sup>®</sup>. Los resultados se presentan como la media de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

## Resultados y discusión

### *Medida de la compatibilidad del extracto enzimático con detergentes comerciales*

En el capítulo de producción y caracterización del extracto enzimático de *P. lilacinum* se observó que éste presentaba, dentro de sus características bioquímicas, una gran estabilidad frente a un amplio rango de pHs y temperaturas, así como también una buena estabilidad frente a surfactantes iónicos y no-iónicos, lo cual haría de este extracto un candidato potencial para ser utilizado como aditivo de detergentes. Además de estas características, para que el extracto enzimático pueda ser utilizado como aditivo en detergentes comerciales, éste debe, entre otras cosas, ser estable y compatible con los mismos. Cuando se evaluó la compatibilidad en presencia de los detergentes sólidos, se observó que el extracto enzimático resultó ser bastante estable, aún a altas temperaturas de incubación (50 °C). A temperaturas intermedias -entre 30 y 40 °C- el extracto enzimático retuvo más del 70 % de su actividad inicial en presencia de cada uno de detergentes sólidos, siendo más estable en presencia de Skip a 30 °C (94.7 %) y en presencia de Ariel a 40 °C (74.5 %). A 50 °C -luego de 1 h de incubación- en presencia de Ariel, éste retiene más del 60 % de su actividad y un 58 % en presencia de Drive (Figura 2 A).

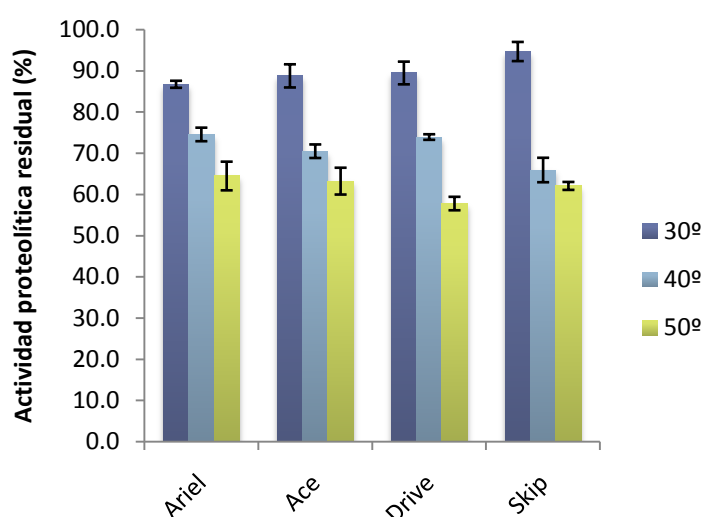


Figura 2 A) Estabilidad del extracto enzimático en presencia de varios detergentes sólidos comerciales. El mismo se incubó en presencia de cada uno de estos detergentes a distintas temperaturas, determinándose luego la actividad residual

*Evaluación como aditivo de detergentes*

La gran diversidad de detergentes comerciales hace que surja la dificultad de comparar los resultados de compatibilidad del extracto enzimático de *P. lilacinum* con otros extractos enzimáticos. Por ejemplo, Savitha et al. (2011) en su estudio de compatibilidad frente a detergentes comerciales utilizan Rin Advanced, Surf Excel, Henko y Kite entre otros; Banerjee et al. (1999) utilizan Surf Excel, Surf Ultra y Rin; Joo et al. (2004) utilizan Brigh, Hanspoon, Spark y Supertie. Sin embargo, se observó que en varias otras publicaciones uno de los detergentes comerciales resultaba ser común entre ellas y con uno de los utilizados aquí, razón por la cual se decidió realizar las comparaciones de los resultados obtenidos en base a la estabilidad y compatibilidad frente al detergente comercial Ariel. En la Tabla 1 se presenta un cuadro comparativo entre las diferentes proteasas reportadas y el extracto enzimático de *P. lilacinum* en cuanto a la estabilidad y compatibilidad de los mismos frente al detergente Ariel. Se observa que el extracto crudo resultó ser más estable que algunas de las proteasas reportadas, incluso más estable que proteasas comerciales utilizadas en esta industria.

Tabla 1. Porcentaje de actividad residual del extracto enzimático de *P. lilacinum* y de otros extractos enzimáticos y proteasas comerciales, luego de ser incubados 1 h a 40 °C en presencia de 7 mg/ml de Ariel sólido

Extractos enzimáticos y proteasas comerciales	Microorganismo	% actividad residual	Referencia
Extracto enzimático	<i>P. lilacinum</i> LPSC # 876	80 %	Cavello et al. (2012)
Proteasa alcalina	<i>Vibrio fluvialis</i> VM10	42 %	Venugopal & Saramma (2006)
Serin-proteasa	<i>Bacillus</i> sp. SSR1	40 %	Singh et al. (2001)
Proteasa alcalina	<i>Bacillus mojavensis</i> A21	100 %	Haddar et al. (2010)
Proteasas alcalinas	<i>Lithognathus mormyrus</i>	57 %	El-Hadj Ali et al. (2011)
Maxacal ®		60 %	Singh et al. (2001)
Purafect ®		60 %	Hmidet et al (2009)

Para el caso de los detergentes líquidos, el extracto enzimático resultó ser más estable en presencia de Ariel que en presencia de Ace, a todas las temperaturas estudiadas

*Evaluación como aditivo de detergentes*

–resultado no observado cuando se trataba de detergentes sólidos donde el porcentaje de actividad residual fue similar en ambos casos. (Figura 2 B).

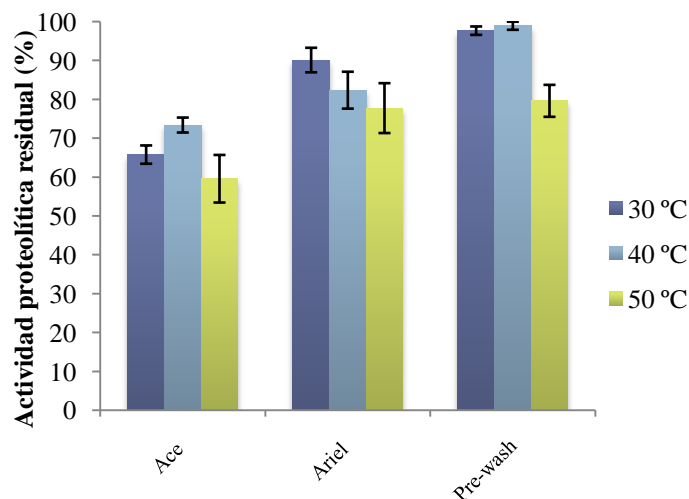


Figura 2 B) Estabilidad del extracto enzimático en presencia de varios detergentes líquidos comerciales. El mismo se incubó 1 h en presencia de cada uno de estos detergentes a distintas temperaturas, determinándose luego la actividad residual

En presencia de Ariel líquido, el extracto enzimático retiene mayor actividad residual a todas las temperaturas estudiadas en tanto que cuando el detergente estudiado es Ace, el mayor porcentaje de actividad residual se observa cuando el detergente es sólido (Figura 2 C)

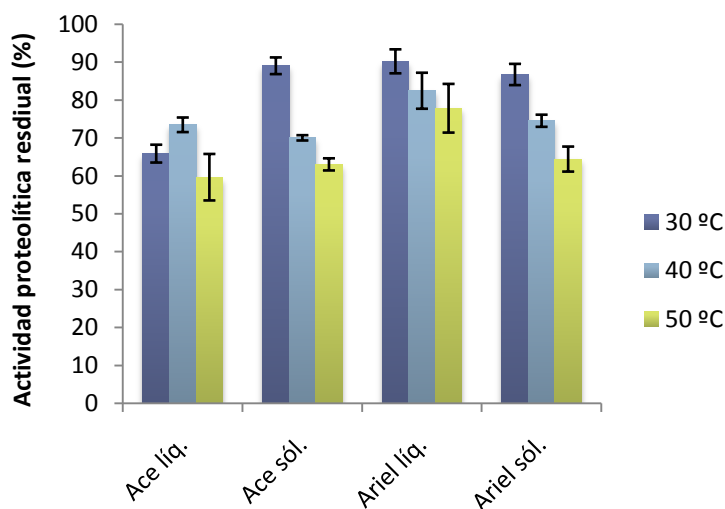


Figura 2 C) Comparación entre un mismo detergente y distinta naturaleza.

## *Evaluación como aditivo de detergentes*

Las variaciones observadas en cuanto a la compatibilidad frente a los distintos detergentes nos demuestran la importancia que tienen los ingredientes que se encuentran en el formulado de estos detergentes a la hora de evaluar a una enzima como candidata a ser utilizada en el formulado.

### ***Efecto de agentes blanqueadores sobre la estabilidad enzimática***

Uno de los ingredientes más comunes presentes en los detergentes comerciales son los agentes blanqueadores u agentes oxidantes. Estos agentes son los responsables de la mayor pérdida de actividad de las enzimas deterativas y actúan oxidando los residuos de metionina presente en estas enzimas. Todas las enzimas comerciales utilizadas en detergentes son subtilisin proteasa, las cuales presentan en su molécula un residuo de metionina continuo a un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual son susceptibles a la inactivación en presencia de estos agentes, siendo esta inactivación un inconveniente a subsanar a la hora de utilizar a la enzima como aditivo. Entonces, una enzima potencialmente candidata a ser usada en detergentes debe poseer una buena estabilidad frente a estos agentes oxidantes (Gupta et al., 1999; Gupta et al., 2002). En la Tabla 1 se observan los resultados del estudio de estabilidad del extracto enzimático de *P. lilacinum* en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de perborato de sodio.

Tabla 1. Efecto de los agentes blanqueadores sobre la actividad del extracto enzimático de *P. lilacinum*. Los datos representan el promedio de tres determinaciones ± DS.

Agente Blanqueador	Concentración (% p/v)	Actividad residual (%)
<b><i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i></b>	1.0	140.0 ± 2.3
	2.0	137.0 ± 0.3
	3.0	122.7 ± 4.0
<b><i>Perborato de Sodio</i></b>	0.2	99.7 ± 2.7
	0.5	97.6 ± 0.9
	1.0	90.8 ± 2.0

Se observó que luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, el extracto enzimático demostraba ser extremadamente estable en presencia de los agentes

### *Evaluación como aditivo de detergentes*

blanqueadores, más aún en presencia de  $H_2O_2$ , la actividad aumentaba. El extracto enzimático de *P. lilacinum* resultó ser más estable que el extracto enzimático de *B. licheniformis* NH1 (Hmidet et al., 2009), el cual retuvo el 85 y el 80 % de su actividad inicial al ser incubados en presencia de  $H_2O_2$  (0.5 % v/v) y de perborato de sodio (0.2 % p/v), respectivamente. Sellami-Kamoun et al. (2008) reportan para el extracto enzimático de *B. licheniformis* RP1 una estabilidad aún mucho más baja, un 68 % y un 48 % de la actividad inicial luego de 1 h de incubación en presencia de  $H_2O_2$  (2.0 % v/v) y de perborato de sodio (0.2 % p/v), respectivamente. Dentro de las proteasas fúngicas reportadas como potenciales candidatas a ser utilizadas en detergentes nos encontramos con dos serin-proteasas purificadas de extractos enzimáticos de *Graphium putredinis* y *Trichoderma harzianum*, respectivamente (Savitha et al., 2011). Estas proteasas resultaron ser menos estables que el extracto enzimático reportado aquí, con un 58.25 % y un 61.33 % de actividad residual para la proteasa de *G. putredinis* y *T. harzianum*, respectivamente, en presencia de 0.2% de perborato de sodio.

Junto con la compatibilidad que presenta el extracto enzimático de *P. lilacinum* frente a los detergentes comerciales es importante destacar la gran estabilidad frente a los agentes oxidantes y frente a SDS (75.9 % de actividad residual) debido a que son escasos los reportes de enzimas de microorganismos wild-type que presentan esta característica (Gupta et al., 1999; Oberoi et al., 2001; Saeki et al., 2002; Beg & Gupta, 2003). Sumado a esto, la estabilidad frente a EDTA (99.6 % de actividad residual) es un punto más a favor para su uso como aditivo de los detergentes comerciales. Las enzimas que son utilizadas en las formulaciones de detergentes no deben requerir de un metal como cofactor debido a que en estas formulaciones la concentración de agentes quelantes es muy alta. Estos agentes quelantes actúan removiendo los iones divalentes presentes en el agua corriente responsables de la dureza de la misma a la vez que asisten a la remoción de la suciedad (Cavello et al., 2012).

Dentro de las proteasas alcalinas utilizadas en los detergentes comerciales existe un importante número de ellas que no son estables frente a estos agentes blanqueadores (Tabla 2), y un número menor (Durazym, Maxapem, Purafect) que han obtenido esta estabilidad gracias a *site-direct mutagenesis* (Maurer, 2004). La Tabla 2 es un cuadro comparativo entre las enzimas comerciales y nuestro extracto enzimático. Si bien el pH óptimo es más ácido que el de las enzimas comerciales, la gran estabilidad que éste posee

### *Evaluación como aditivo de detergentes*

(retiene más del 70 % de actividad residual luego de 2 h de incubación a pH 11.0) lo hace estar a la altura de estas enzimas, más aún, como se mencionó anteriormente posee una característica adicional que éstas no poseen que es la gran estabilidad a agentes oxidantes y blanqueadores.



*Evaluación como aditivo de detergentes*

Tabla 2. Cuadro comparativo de características relevantes entre proteasas comerciales y el Extracto enzimático de *P. lilacinum*

Proteasas comerciales	Microorganismos	pH óptimo	Temperatura óptima	Estabilidad frente a agentes blanqueadores u oxidantes	Proveedor
Extracto enzimático	<i>P. lilacinum</i> LPS #876	6-7	50-60	+	
Alcalase	<i>B. licheniformis</i>	7-10	60	-	Novozymes
Savinase	<i>B. lentus</i>	8-11	50-60	-	Novozymes
Esperase	<i>B. lentus</i>	7-12	50-65	-	Novozymes
Maxatase	<i>B. subtilis</i>	9-10	50-60	-	Gist-Brocades
Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	8-11.5	15-60	-	Solvay enzymes
Optimase	<i>B. licheniformis</i>	7.5-10.5	15-65	-	Solvay enzymes
Everlase	Variante de Savinase ® (modificada por ingeniería de proteínas)	8-11	50	+	Novozymes
Durazym	Variante de Savinase ® (modificada por ingeniería de proteínas)	8-11	50	+	Novozymes
Maxapem	Variante modificada por ingeniería de proteínas de <i>Bacillus</i> sp.	11-12	60	+	Solvay enzymes
Purafect	Gen de <i>B. lentus</i> expresado en <i>Bacillus</i> sp.	10	40-65	+	Genecor International

**Evaluación de la eficacia de lavado**

Las proteínas presentes en la suciedad o en las manchas de las prendas son primero removidas de la superficie por algunos componentes de los detergentes o por el agua corriente. Dependiendo del tamaño de los fragmentos que son removidos en esta primera etapa, pueden solubilizarse y quedar en el seno del agua de lavado o re-depositarse sobre la prenda, dejando la sensación de falta de remoción de las manchas. Cuanto mejor sea la enzima presente en el detergente, mejor será la remoción de la suciedad ya que la hidrólisis de los fragmentos de proteínas adheridas a las prendas facilita su remoción y evita la re-deposición de estas (Hmidet et al., 2009). Los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad del extracto enzimático de *P. lilacinum* de remover manchas de sangre fueron satisfactorios (Figura 3). Del análisis visual de las piezas de algodón se observó que el reemplazo de las enzimas endógenas presentes en el detergente Skip por el extracto enzimático dio similares resultados que el detergente original a las dos temperaturas ensayadas (Figura 3 C; F; I y L). Resultados similares han sido reportados alrededor del mundo para distintos extractos enzimáticos (Abidi et al., 2008; Jellouli et al., 2011; Savitha et al., 2011).

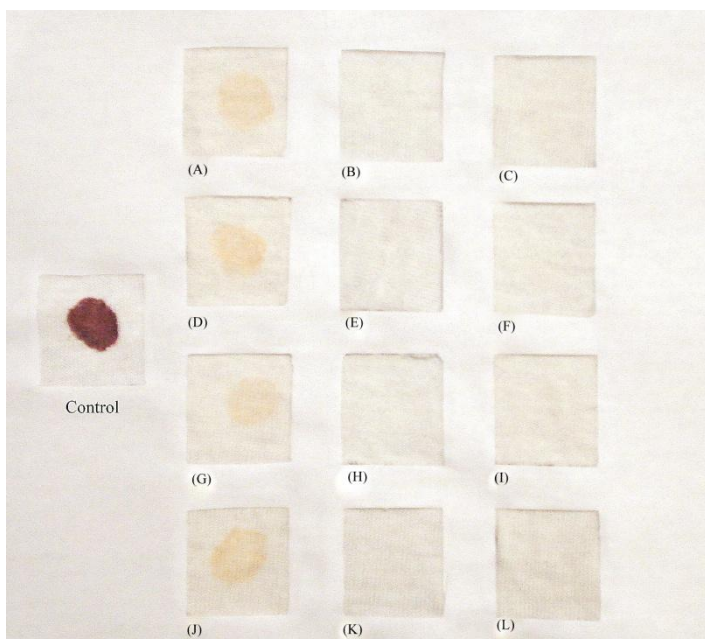


Figura 3.

Estudio de la capacidad del extracto enzimático de *P. lilacinum* de remover manchas de sangre presentes en prendas de algodón en presencia de los ingredientes del detergente Skip. Los lavados se realizaron a dos temperaturas distintas 30 °C (A-F) y a 40°C (G-L), durante 30 minutos (A-C)-(G-I) y 60 minutos (D-F)-(J-L). Las piezas (A), (D), (G) y (J) corresponden a las aquellas lavadas con agua corriente, las piezas (B), (E), (H) y (K) son aquellas lavadas con Skip y las piezas (C), (F), (I) y (L) son las piezas lavadas con el extracto enzimático de *P. lilacinum* en presencia del detergente Skip.

## **Conclusiones**

De los resultados presentes en este capítulo se puede concluir que el extracto enzimático de *P. lilacinum* LPSC# 876 resulta de gran interés para su aplicación en el campo de los detergentes. Comparado con las enzimas comerciales que hoy en día se usan en esta industria, se observa que posee las mismas o incluso mejores características bioquímicas tales como poseer una gran estabilidad a los agentes blanqueadores u oxidantes, así como la estabilidad frente a EDTA y SDS. En cuanto a la su compatibilidad y estabilidad frente a los distintos detergentes comerciales a distintas temperaturas se puede concluir que para ciclos de lavados largos (60 min) el extracto enzimático sería más efectivo si se lo utiliza a temperaturas de entre 30 y 40 °C y para ciclos de lavado cortos (10-30 min) podría ser utilizado incluso a altas temperaturas (50 °C). En el caso de utilizarse Ariel líquido, el extracto enzimático también podría ser utilizado en ciclos de lavado largos aún a 50 °C dado que en esas condiciones retiene un 78 % de su actividad original. Este es el primer reporte del potencial uso del extracto enzimático de *P. lilacinum* como aditivo de detergentes (Cavello et al., 2012).

**Bibliografía**

- Abidi, F., Limam, F., and Nejib, M. (2008) Production of alkaline protease by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biodetergent. *Process Biochemistry* 43:1202-1208
- Antrim R, Buchert J, and Burriws H (2004) Industrial Enzymes: Enzymes in Nonfood Applications. In: *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Second Edition. 155-161
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., and Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35:213- 219
- Barfoed HC (1981) Detergents. In: *Industrial Enzymology*, Godfrey T (ed) Macmillan, London, pp 284-293
- Beg, K. & Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidant-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32:294- 304
- Cavello, I.A., Hours, R., and Cavalitto, S.F. (2012) Bioprocessing of "Hair Waste" by *Paecilomyces lilacinus* as a source of a bleach-stable, alkaline, and thermostable keratinase with potential application as a laundry detergent additive: characterization and wash performance analysis. *Biotechnology Research International* 2012:1- 12
- Gupta, R., Beg, K., and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:15- 32
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K., and Khan, S. (1999) Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 21:135- 138
- Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., and Nasri, M. (2010) Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21. *Biochemical Engineering Journal* 51:53- 63
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2009) Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* 47:71- 79
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ben Ayed, H., Manni, L., Agrebi, R., and Nasri, M. (2011) Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry* 46:1248- 1256
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., and Chang, C.S. (2004) Bleach-resistant alkaline protease produced by *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaeta, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry* 39:1441- 1447
- Maurer, K.H. (2004) Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology* 15:330- 334

- Nielsen, M.H., Jepsen, S.J., and Oyttruo, H. (1981) Enzymes for low temperature washing. *Journal of American Oil Chemists` Society* 58:644- 649
- Oberoi, R., Beg, K., Puri, S., Saxena, R.K., and Gupta, R. (2001) Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from *Bacillus sp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:493- 497
- 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* 62:597- 635
- Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., and Takaiwa, M. (2002) A novel species of alkalophilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* 6:65- 72
- Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K., and Lin, F.H. (2011) Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42:298- 304
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., and Moncef, N. (2008) Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP 1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research* 163:299- 306
- Shankar, S., Rao, M.B., and Laxman, R. (2011) Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria sp.* *Process Biochemistry* 46:579- 585



# *Hidrólisis enzimática de placas radiográficas para la recuperación de plata*

## **Resumen**

En el presente capítulo se describe la utilización del extracto enzimático producido por *Purpureocillium lilacinum* en la hidrólisis enzimática de las capas de gelatina presentes en las placas radiográficas con el fin de recuperar plata. Se estudiaron varios factores que influyen en la hidrólisis de las placas radiográficas como ser el efecto de la temperatura en el proceso de hidrólisis, el efecto de la concentración enzimática y la posibilidad del reúso del extracto enzimático en el proceso de hidrólisis. Como primer paso para estudiar el potencial uso del extracto enzimático en la recuperación de plata presente en las placas radiográficas se llevó a cabo una hidrólisis a 37 °C observándose una remoción completa de la capa de gelatina y la concomitante liberación de la plata luego de 33 minutos de reacción. Este primer resultado nos llevó a plantear la posibilidad de optimizar el proceso para mejorar el tiempo de hidrólisis. Se observó que utilizando 6.9 U azoc/ml de extracto enzimático, una temperatura de 60 °C y un pH de 9.0, la hidrólisis completa de las placas radiográficas ocurría en sólo 6 minutos. Aprovechando el efecto protector que ejerce el glicerol y el propilenglicol frente a la inactivación térmica de las queratinasas, se probó la capacidad de reutilizar el extracto enzimático sometándolo a procesos de hidrólisis repetidos. Así, pudo observarse que en presencia de glicerol, el extracto enzimático pudo ser utilizado más veces que en ausencia del mismo. Se lograron 7 ciclos de reúso frente a 3 ciclos en ausencia de agentes protectores.

## Introducción

Mundialmente más de 2 billones de radiografías son tomadas cada año por los servicios médicos e incluyen placas de tórax, mamografías, tomografías, placas dentales, etc. Cuando se observa una placa radiográfica se pueden diferenciar dos zonas: una zona negra y una zona blanca o más clara. La zona negra constituye la zona que ha sido expuesta y está constituida por átomos de plata ( $\text{Ag}^0$ ) que rodean a los cristales de halogenuro de plata iniciales. La  $\text{Ag}^0$  se forma debido a la acción de una sustancia química reductora que cede electrones a los haluros de plata durante el revelado. El haluro de plata reacciona según:

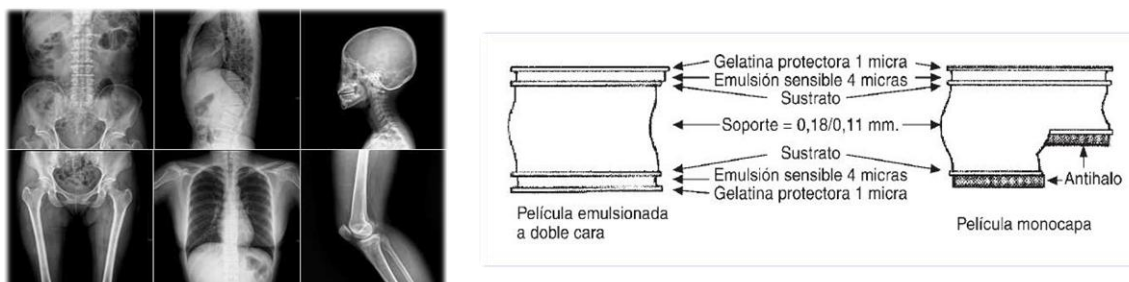


La sustancia química reductora suele ser un compuesto aromático del tipo del polifenol (por ejemplo, la hidroquinona). En tanto que la zona blanca es la zona originada por la acción de productos químicos que actúan sobre el haluro de plata que no se ha expuesto a la luz. Estas zonas y sus matices se muestran en la Figura 1. Estas zonas terminan siendo la información que capta la película y que permite determinar las lesiones presentes en los pacientes.

Una placa radiográfica está compuesta por cuatro zonas diferenciadas (Figura 1). Una primera zona llamada *emulsión* sensible a la radiación X, extendida por una sola o ambas caras de la película. Esta capa está constituida por una fina suspensión de microcristales de halogenuros (cloruros, bromuros, yoduros) de plata en gelatina. La zona central es el *soporte* (lámina de tereftalato de polietileno, más conocido por sus siglas en inglés *PET*, *polyethylene terephthalate*) de gran resistencia mecánica, de color azulado y cierta rigidez. La perfecta cohesión entre las capas de *emulsión* y el *soporte* se consigue mediante un tratamiento químico que constituye la zona llamada *sustrato*. Sobre la *emulsión* hay un delgado recubrimiento de gelatina endurecido, que actúa como capa protectora de la delicada superficie de la *emulsión* contra abrasiones y rozamientos.



*Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*



Figuras 1. Zonas de las placas radiográficas

Desde que la película virgen recibe la imagen que le envían las pantallas de refuerzo hasta que la imagen está lista, deben de suceder una serie de procesos complejos, inicialmente en el interior de la propia *emulsión* y finalmente en el exterior, con el proceso de revelado. La *emulsión* en el estado virgen está formada por cristales de halogenuro de plata de forma triangular a hexagonal, de tamaños heterogéneos, dispersos en gelatina. Es esta heterogeneidad la que da a las emulsiones su efecto contrastante y la posibilidad de dar una extensa gama de grises. Cuando se produce la exposición, la radiación produce una alteración en los cristales de halogenuro de plata como consecuencia de procesos electrónicos donde se produce una excitación de un electrón desde la banda de valencia hasta la banda de conducción del haluro de plata (banda GAP = 2.7 eV, para el bromuro de plata) desencadenando así un proceso que genera cristales de  $Ag^{\circ}$ . Con pequeñas intensidades de radiación, se alteran únicamente los cristales más grandes, porque por su mayor área proyectiva tienen mayor probabilidad de capturar fotones. Es en este momento cuando realmente se ha formado una imagen en la *emulsión*. Se constituye en cada punto de la película cristales alterados en número proporcional a la cantidad de radiación recibida localmente. Esto es lo que se conoce como *imagen latente*, que si bien es estable y permanente, no es apreciable a la vista.

Para obtener la imagen definitiva se debe aplicar el proceso de revelado-fijado. Es en el revelado donde se transforman los cristales irradiados y alterados en plata metálica finamente dividida de color negro, mediante productos químicos como la hidroquinona o el metol, que lo que hacen es oxidarse y producir la reducción de la plata, ennegreciéndola. Los cristales no irradiados no padecen ninguna modificación y son eliminados en el proceso de fijación. De esta forma, según sea la penetración de la

## *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

radiación, se distinguirán las zonas blancas y negras anteriormente mencionadas, con sus correspondientes matices (Mauri et al., 2002).

Se calcula que la cantidad de plata presente en las placas radiográficas varía entre 1.5 y 2.0 % en peso. Según varios reportes, el 25% de las necesidades mundiales de plata son saciadas mediante el reciclaje, del cual el 75% es obtenido de desechos fotográficos, lo que hace que este residuo sea una fuente interesante de la cual recuperar este metal precioso (Nakiboğlu et al., 2001). Existen actualmente, dos caminos para la recuperación de la plata presente en las placas radiográficas: el primero es la combustión de estos residuos y el segundo es un proceso de recuperación del metal por métodos químicos. Mediante el proceso de combustión, tal como la palabra lo indica, las placas radiográficas son incineradas a altas temperaturas y la plata es recuperada desde las cenizas por un proceso de fundición. Este proceso produce no sólo olores indeseables, sino que durante la incineración se generan productos de desecho tóxicos para el medio ambiente causando la polución del mismo. A lo que se suma la imposibilidad de recuperar el *soporte* (Shankar et al., 2010).

En los métodos químicos, las placas radiográficas son remojadas con productos químicos como tiosulfato de amonio, tiosulfato de sodio, ácido nítrico, cianuro de sodio, álcalis u solventes orgánicos, produciendo desechos extremadamente tóxicos para el medio ambiente. Además, estos procesos requieren de mucho tiempo y suelen demandar gran cantidad de energía térmica, especialmente cuando se utilizan bases o álcalis (Ishikawa et al., 1993).

Con la creciente demanda a nivel mundial de este metal precioso se ha comenzado a focalizar la recuperación de la  $Ag^0$  a partir de los desechos radiográficos buscando una alternativa más amistosa con el medio ambiente y es allí donde aparecen los métodos enzimáticos como una alternativa. Los métodos enzimáticos se basan principalmente en la hidrólisis de las capas de gelatina presente en las placas radiográficas y es mediante éste proceso donde no sólo es posible recuperar la plata sino que también es posible la recuperación y el reciclado del soporte (PET) (Nakiboğlu et al., 2001). En los últimos años el estudio de la aplicación de métodos enzimáticos ha ido incrementándose, focalizándose sobre todo en el uso de proteasas de origen bacteriano (Fujiwara et al., 1991; Singh et al., 1999; Nakiboğlu et al., 2001; Masui et al., 2004).

### *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

Shankar et al. (2010) es el único reporte del uso de proteasas de origen fúngico para este cometido, así es que motivados con los potenciales usos que se le podían dar al extracto enzimático y con este antecedente, se decidió probar la factibilidad de recuperar plata mediante la hidrólisis enzimática de la película de gelatina con el extracto enzimático producido por *P. lilacinum*.

## **Materiales y métodos**

### ***Obtención del extracto enzimático con actividad queratinolítica***

Para el estudio de la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 cosechado al 5<sup>to</sup> día de cultivo con 10 g/l de residuo pelo como sustrato queratínico (6.9 U azoc/ml).

### ***Medida de la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas (o de las películas de gelatina)***

Porciones de 2.5 cm x 2.5 cm de placas radiográficas fueron lavadas y limpiadas primero con agua destilada y luego con alcohol, para ser secadas en estufa a 40 °C por un período de 30 min. Una porción de placa radiográfica (0.1627 g) se incubó con 5 ml del extracto enzimático (6.9 U azoc/ml, pH 9.0) asegurándose de que la misma se encuentre completamente sumergida, en un baño termostático a 37 °C con agitación orbital continua. Periódicamente se tomaron muestras para monitorear el progreso de la reacción. La hidrólisis de la película de gelatina trae aparejada la liberación de las partículas de plata y un aumento en la turbidez de la mezcla de reacción, razón por la cual, el progreso de la reacción se realizó mediante la medición del cambio en la medida de turbidez de la mezcla de reacción a 660 nm. Se definió el tiempo de hidrólisis el tiempo necesario para que la medida a 660 nm llegue a un máximo (Fujiwara et al., 1991; Shankar et al., 2010). Se hizo un blanco de reactivos para estudiar la liberación de las partículas de plata de forma no enzimática colocando una porción de placa radiográfica en 5 ml de Buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9.0. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

### ***Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de las películas de gelatina***

Para el estudio del efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas, se realizó el mismo procedimiento descrito en el inciso anterior, pero variando la temperatura de incubación en un rango de entre 28 °C a 65 °C, teniendo la precaución de pre-calentar el extracto enzimático a la temperatura deseada por el

### *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

término de 2 minutos antes de agregar la porción de placa radiográfica, comenzando luego a registrar el tiempo de hidrólisis y a tomar muestras periódicamente para realizar la medida de turbidez a 660 nm. El grado de hidrólisis se expresó como porcentaje respecto a la mayor absorbancia obtenida para cada temperatura, la cual se tomó como 100 % de hidrólisis. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

### ***Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de la película de gelatina***

El estudio del efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de las películas de gelatina con la concomitante liberación de partículas de plata se llevó a cabo incubando porciones de 2.5 cm x 2.5 cm (0.1627g) con 5 ml del extracto enzimático a 60 °C, pH 9.0. La concentración enzimática se varió desde 1.7 U azoc/ml a 34.5 U/ml. Periódicamente se tomaron muestras de cada experiencia siguiendo el grado de hidrólisis a 660 nm hasta remoción completa de las partículas de plata. El grado de hidrólisis se expresó como porcentaje respecto a la mayor absorbancia obtenida para cada concentración, la cual se tomó como 100% de hidrólisis. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS.

### ***Reutilización del extracto enzimático para la hidrólisis completa de las películas de gelatina y remoción total de las partículas de plata***

Para el estudio de reutilización del extracto enzimático se llevó a cabo la experiencia de hidrólisis descrita anteriormente en la cual 0.1627g de placa radiográfica se pusieron en contacto con 5 ml del mismo (6.9 U azoc/ml) a 60 °C observando periódicamente hasta remoción completa de la plata, en ese momento se extrajo la placa radiográfica y se colocó a la misma mezcla de reacción una placa radiográfica nueva y así sucesivamente hasta que no se observó más progreso en la hidrólisis. El tiempo requerido para la completa remoción de las películas de gelatina o la remoción completa de las partículas de plata se utilizó como indicador de la actividad remanente de la mezcla de reacción en cada ciclo (Shankar et al. 2010). El mismo experimento se realizó en presencia de propilenglicol y glicerol (10 % v/v) como agentes protectores frente a la inactivación térmica del extracto enzimático (capítulo 4).

## *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

### ***Recuperación de plata como cloruro de plata***

El porcentaje de recuperación de la plata por medio del tratamiento enzimático se calculó teniendo en cuenta dos datos. El primero fue la pérdida de peso de las placas radiográficas luego del tratamiento enzimático y el segundo, la cantidad (g) de cloruro de plata obtenido por la hidrólisis de 15 g de placas. Para la recuperación de plata en forma de cloruro de plata se siguió el protocolo descrito por Christian, G.D. (1994).

## Resultados y discusión

### *Medida de la hidrólisis enzimática de las placas radiográficas (o de las películas de gelatina)*

La primera prueba que se llevó a cabo fue la incubación directa del extracto crudo (6.9 U azoc/ml) con una porción de una placa radiográfica de 2.5 cm x 2.5 cm a 37 °C. Se pudo observar que el extracto crudo hidrolizó el 41.0 % de la película de gelatina luego de 15 minutos de incubación y la completa remoción se observó luego de pasados los 33 minutos (Figura 3). Teniendo este primer resultado positivo, se decidió buscar bajo qué condiciones la hidrólisis completa de la película de gelatina con la concomitante liberación de las partículas de plata tenía lugar en el menor tiempo posible.

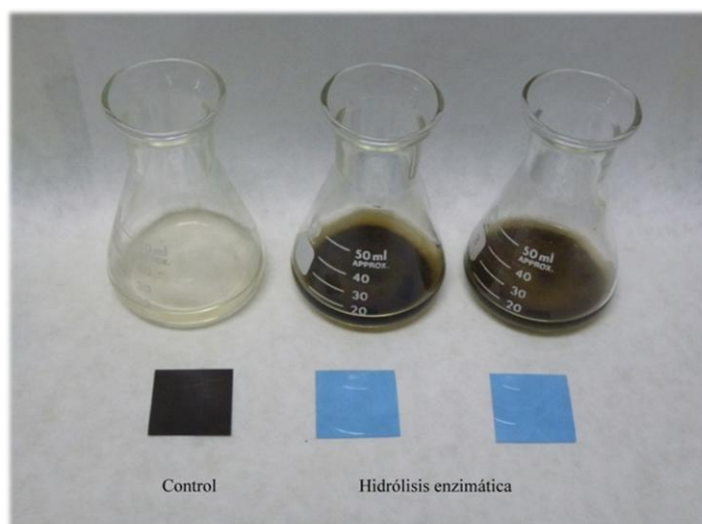


Figura 3. Hidrólisis enzimática de las placas radiográficas a 37°C

### *Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de las películas de gelatina*

Primero, se estudió el efecto de la temperatura en el tiempo de hidrólisis. El rango de temperaturas estudiado fue entre los 28 °C y los 65 °C. En la Figura 4 se muestra el perfil de hidrólisis con respecto al tiempo a distintas temperaturas. Se puede observar que los perfiles presentan una forma muy particular con una fase *lag* o periodo de inducción, que está relacionada/o con la naturaleza de la reacción de hidrólisis (reacción heterogénea). Esta fase *lag* se produce por la dificultad de difusión de la

*Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

enzima desde el seno de la solución (*bulk*) a la película de gelatina debido a la resistencia en la transferencia de masa. Durante el transcurso de la reacción, la cantidad de enzima que se adsorbe a la placa radiográfica aumenta, resultando en un aumento en el porcentaje de hidrólisis (Ishikawa et al., 1993; Masui et al., 2004). Se observa claramente que a medida que aumenta la temperatura de incubación, la velocidad de hidrólisis aumenta, llegando a un máximo en los 60 °C. El tiempo requerido para la hidrólisis total de la placa radiográfica fue de 20 minutos a una temperatura de incubación de 50 °C en tanto que para 60 °C el tiempo fue poco más de 3 veces menor (6 min). A temperaturas mayores que 60 °C hay una caída en la velocidad de hidrólisis, la cual puede deberse a la inactivación térmica que sufre la enzima.

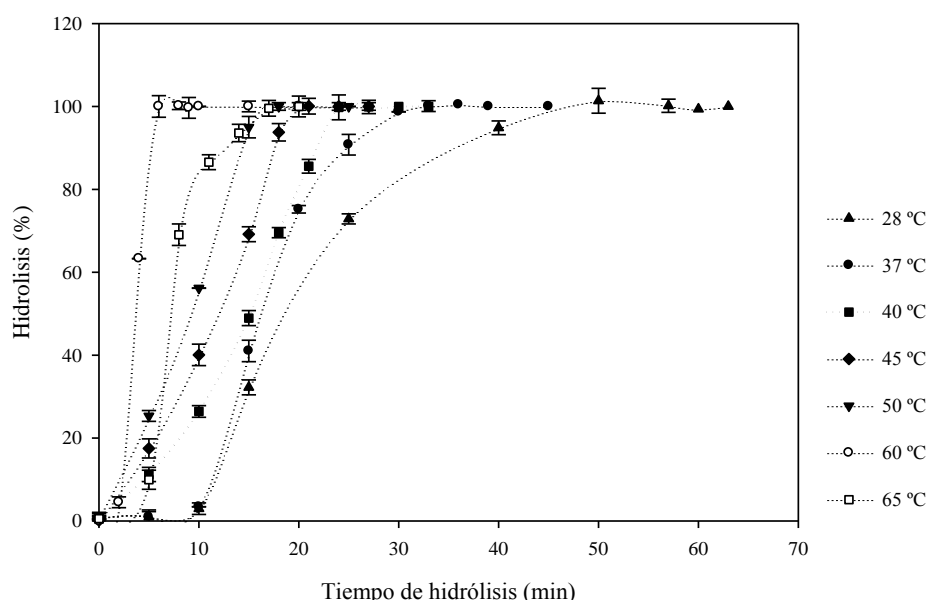


Figura 4. Efecto de la temperatura de incubación en el tiempo de hidrólisis de la película de gelatina

Cuando se comparan estos resultados con los reportados en literatura, se puede ver que la hidrólisis enzimática llevada a cabo por proteasas del género *Bacillus* presenta una temperatura “óptima” de hidrólisis menor que la que presenta éste extracto enzimático. Así, Masui et al. (1999) reportan que, una proteasa de *Bacillus* sp. B21-2 a 50 °C hidroliza completamente las placas radiográficas al cabo de 45 minutos, mientras que Nakiboğlu et al. (2001) reportan que la proteasa de *Bacillus subtilis* ATCC 663 tarda menos de 15 minutos en completar la hidrólisis a la misma temperatura de



### *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

incubación. Ambas enzimas a temperaturas mayores que 50 °C sufren rápidamente su inactivación. Singh et al. (1999) por su parte reportan que el tiempo de hidrólisis del extracto enzimático de *Bacillus sphaericus* a 50 °C resulta ser de 8 minutos y a 60 °C de 7 minutos. Shankar et al. (2010) son los únicos que reportan el uso de una proteasa fúngica (de *C. coronatus*) para la hidrólisis de placas radiográficas. Esta proteasa fúngica completa la hidrólisis en 6 minutos a una temperatura menor que la reportada aquí (40 °C), a temperaturas más altas que 40 °C la enzima se inactiva térmicamente. Por lo antes expuesto, se eligió como temperatura de trabajo 60 °C dado que es la temperatura a la cual el tiempo requerido para la hidrólisis completa de las placas radiográficas es mínimo.

### *Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de la película de gelatina*

Una vez fija la temperatura de trabajo, se procedió al estudio del efecto de la cantidad de enzima (en términos de unidades enzimáticas) en la hidrólisis de las placas radiográficas. El rango de actividades probados varió entre 1.7 y 34.5 U azoc/ml. Como era de esperar, el tiempo de hidrólisis fue mayor cuanto menor fue la actividad enzimática. Se puede observar en la Figura 5 que cuando la actividad enzimática aumentó más allá de 6.9 U azoc/ml el tiempo de hidrólisis no disminuyó tanto como lo esperado, sugiriendo que a mayores actividades enzimáticas el limitante de la reacción enzimática es la película de gelatina presente en la placa radiográfica (la superficie expuesta a la enzima).

De los resultados anteriores, 6.9 U azoc/ml resultó ser la cantidad adecuada de enzima capaz de hidrolizar 0.1627 g en un tiempo de 6 minutos. Mayores cantidades de actividad no reducen el tiempo de hidrólisis.

*Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

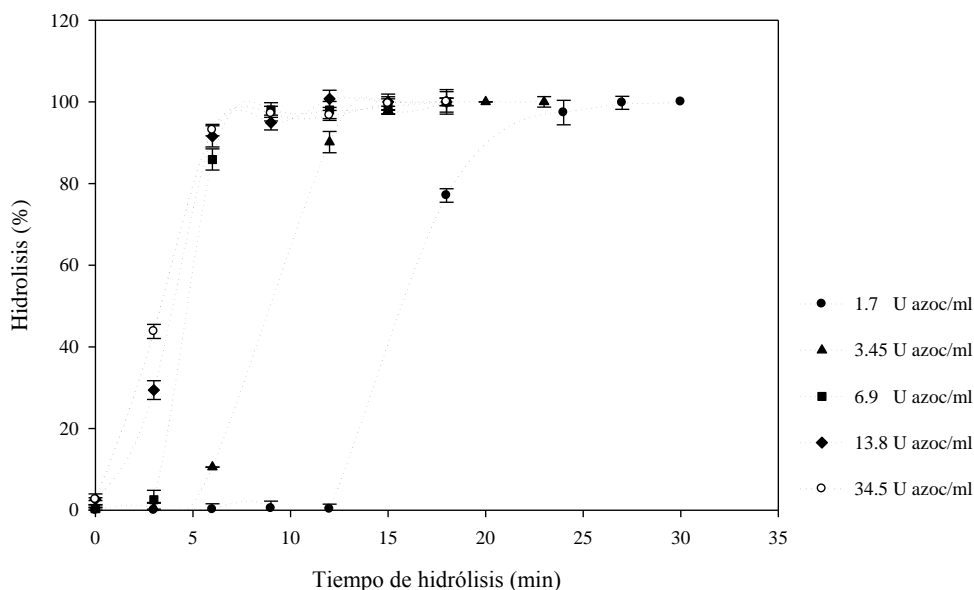


Figura 5. Efecto de la concentración enzimática en el tiempo de hidrólisis de la película de gelatina

Los resultados obtenidos en este punto sólo pueden ser comparados con los reportados por Singh et al. (1999), debido a que son los únicos autores que utilizan el mismo sustrato (azocaseína) para la medida de actividad proteolítica. Los tiempos de hidrólisis del extracto proteolítico producido por *B. Sphaericus* varían entre 24 a 8 minutos cuando la concentración enzimática varía entre 10 y 100 U azoc/ml. Si se comparan las unidades enzimáticas necesarias para hidrolizar 1 gramo de placas radiográficas, se observa que, mientras que Singh et al. (1999) necesitan de 250 U/g placa, 127.8 U del extracto enzimático de *P. lilacinum* son necesarias para hidrolizar la misma cantidad. Lo cual demuestra que este extracto enzimático resulta ser mejor, no sólo por la menor cantidad de enzima necesaria para hidrolizar la misma cantidad de material, sino también por la disminución en el tiempo requerido para dicha hidrólisis.

*Reutilización del extracto enzimático para la hidrólisis completa de las películas de gelatina y remoción total de las partículas de plata*

Una vez determinadas la cantidad de unidades enzimáticas y la temperatura necesaria para optimizar el tiempo de la hidrólisis de las placas radiográficas, se estudió la posibilidad del re-uso del extracto. Para ello, se hicieron ciclos de hidrólisis tal como

*Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

se describió anteriormente, anotando el tiempo de duración de cada ciclo, retirando la placa y agregando una nueva placa al momento de finalizado el ciclo de hidrólisis anterior. Estos ciclos de hidrólisis se hicieron en ausencia y presencia de dos agentes protectores (propilenglicol y glicerol, 10 % v/v) los cuales fueron seleccionados previamente por ser los que mejor protegían a la enzima de la desnaturalización térmica.

Se encontró que el extracto crudo en ausencia de agentes protectores pudo ser sometido a 3 ciclos de hidrólisis completos, al igual que cuando se adicionó propilenglicol. Para el caso del glicerol este número aumentó, llegándose a someter al extracto enzimático a 7 ciclos de hidrólisis. En todos los casos se observó que el tiempo necesario para completar la hidrólisis aumentó con cada uno de los ciclos (Tabla 1). Sin embargo, en presencia de los polioles dicho aumento fue menor que en control, demostrando el efecto protector de éstos frente a la inactivación térmica. Se observa que el mayor efecto protector lo ejerce el glicerol, no sólo por la cantidad de ciclos de hidrólisis que pudieron llevarse a cabo, sino también por los tiempos necesarios para culminar cada ciclo.

Tabla 1. Reutilización del extracto enzimático para la hidrólisis completa de las películas de gelatina y remoción total de las partículas de plata

	Tiempo requerido para la remoción completa de la película de gelatina (min)							
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	ciclo 4	ciclo 5	ciclo 6	ciclo 7	ciclo 8
<b><i>Extracto enzimático</i></b>	6	15	23	Hi*	-	-	-	-
<b><i>E.E. + propilenglicol</i></b>	6	12	25	Hi*	-	-	-	-
<b><i>E.E. + glicerol</i></b>	6	9	15	20	25	28	32	Hi*

\*Hi hidrólisis incompleta luego de 45 minutos de incubación

Este incremento en el tiempo de hidrólisis luego del primer ciclo también fue observado en los trabajos de Shankar et al. (2010) y de Masui et al. (1999). Estos autores son los únicos que estudian la posibilidad de reutilizar el extracto enzimático en

### *Aplicación en la hidrólisis de placas radiográficas*

ciclos repetitivos de hidrólisis. Masui et al. (1999) reportan que el primer ciclo de hidrólisis a 50 °C tomó 60 minutos en ser completado y el segundo ciclo más de 2h. En tanto que el extracto enzimático producido por *C. coronatus* a 40 °C pudo ser reutilizado por 4 ciclos (Shankar et al., 2010). Por otro lado, resulta interesante señalar que, si bien Fujiwara et al. (1991) y Singh et al. (1999) estudian el efecto protector del catión divalente  $\text{Ca}^{2+}$  en la inactivación térmica de sus extractos enzimáticos, ninguno de ellos estudió la posibilidad de reutilizar el mismo en ciclos consecutivos de hidrólisis ni poder utilizar éste catión para estabilizar el extracto enzimático. Siendo éste, el primer reporte del uso de polioles en la estabilización térmica de un extracto enzimático que va a ser reutilizado en la hidrólisis de placas radiográficas con el objetivo de recuperar plata (Cavello et al., 2013).

Finalmente, luego de someter 15 g de placas radiográficas al proceso de hidrólisis enzimática por queratinasas de *P. lilacinum*, la pérdida en peso fue de alrededor de  $4.6 \pm 0.1$  %. El contenido total de plata (en forma de  $\text{AgCl}$ ) en el hidrolizado fue determinado gravimétricamente y resultó ser de 0.62 % del peso total de las placas radiográficas. La cantidad de plata recuperada en este trabajo resultó ser mayor que la recuperada por Shankar et al. (2010) y por Ingale et al. (2002) quienes recuperaron 0.2 % p/p y 0.1 % p/p, respectivamente.

El cloruro de plata así como tal, puede ser utilizado en la elaboración de papel fotográfico, esmaltes para cerámicas, en la fabricación de vidrios de colores, y en celdas para espectrofotómetros y para equipos de FT-IR, así como también en el área medicinal en vendajes y productos para la cicatrización de heridas (Shankar et al., 2010).

## Conclusiones

Debido a la creciente industrialización, la demanda de metales pesados ha ido incrementándose paulatinamente, mientras que las reservas naturales de los mismos han ido disminuyendo, despertando la necesidad de explorar fuentes alternativas de extracción de estos metales pesados. Dentro de los residuos industriales que poseen metales pesados nos encontramos con desechos electrónicos, residuos de las industrias de acabado de metales, catalizadores utilizados en la industria del petróleo, baterías de Ni-Cd, desechos médicos, etc. Dentro de estos últimos encontramos a las placas radiográficas, a partir de las cuales es posible recuperar partículas de plata. El extracto enzimático producido por *P. lilacinum* LPSC # 876 resultó ser eficaz en la hidrólisis completa de las películas de gelatina y la concomitante liberación de las partículas de plata. Los resultados obtenidos en este capítulo se encuentran al nivel de otros reportes e incluso son mejores. Este es el segundo reporte de la utilización de un extracto enzimático de origen fúngico y el primer reporte para la cepa *P. lilacinum* LPSC # 876 para la recuperación de plata a partir de desechos médicos. Es el primer reporte que plantea la posibilidad utilizar un agente estabilizante (glicerol) en ciclos sucesivos de hidrólisis con una sola dosis de enzima (Cavello et al., 2013). La plata presente en el hidrolizado pudo ser recuperada por un método gravimétrico en forma de cloruro de plata.

**Bibliografía**

- Cavello, I., Hours, R., and Cavalitto, S. (2013) Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Journal of Microbiology and Biotechnology* :1-23
- Christian GD (1994) *Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, New York, pp 683-686
- Fujiwara, N., Yamamoto, K., and Masui, A. (1991) Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used x-ray film. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 72:306- 308
- Ingale, S.S., Rele, M., and Srinivasan, M.C. (2002) Alkaline protease production by *Basidiobolus* (N.C.L. 97.1.1): effect of "darmform" morphogenesis and cultural conditions on enzyme production and preliminary enzyme characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:403- 408
- Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., and Fujiwara, N. (1993) Kinetic and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76:300- 305
- Masui, A., Fujiwara, N., Takagi, M., and Imanaka, T. (1999) Feasibility study for decomposition of gelatin layers on X-ray films by thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Techniques* 13:813- 815
- Masui, A., Yasuda, M., Fujiwara, N., and Ishikawa, H. (2004) Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on used lith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and PET. *Biotechnology progress* 20:1267- 1269
- Mauri, J., Coda, F., and Pujol, R. (2002) Recuperación de plata de las radiografías. *Técnica Industrial* 245:32- 37
- Nakibođlu, N., oscali, D., and a<sup>o</sup>a, I. (2001) Silver recovery from waste photographic films by an enzymatic method. *Turkish Journal of Chemistry* 25:349- 353
- Shankar, S., More, S.V., and Seeta Laxman, R. (2010) Recovery of silver from waste x-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 6:60- 69
- Singh, J., Vohra, R.M., and Sahoo, D.K. (1999) Alkaline protease from a new obligate alkaliphilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters* 21:921- 924

## *Aprovechamiento del hidrolizado obtenido de la biodegradación del residuo pelo para su aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

### **Resumen**

Las fitohormonas son sustancias bioactivas presentes en las plantas que controlan diversos procesos del desarrollo vegetal. Las aplicaciones prácticas de estos compuestos son muy diversas y su utilización actual en agricultura es frecuente y está en continuo aumento. La industria agroquímica proporciona un amplio repertorio de fitorreguladores que, en general, se obtienen por síntesis química. Por otra parte, la agricultura industrial se enfrenta a una problemática importante debido a una mayor sensibilidad de la sociedad ante los problemas medioambientales y una mayor valoración de los productos ecológicos por los consumidores de los países desarrollados. Existe por lo tanto, un interés creciente en desarrollar una agricultura sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento sintéticos (análogos a las fitohormonas) por productos naturales.

La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de los caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto ambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente más atractiva.

En este capítulo se presenta la evaluación del efecto del hidrolizado proteico y enzimático -obtenido luego de la degradación del residuo pelo por parte de *P. lilacinum* LPSC # 876 – sobre la germinación de semillas de tomate, así como también la realización de pruebas de promoción del crecimiento de plantas de tomate en macetas con soporte inerte y estéril. Se determinó la presencia en el hidrolizado de compuestos promotores del crecimiento vegetal, tales como el ácido indolacético y sideróforos, razón por la cual se decidió optimizar el medio de cultivo de tal manera de maximizar la producción por parte del hongo de estos dos compuestos. Se evaluó el contenido de nitrógeno del medio, así como de la actividad proteolítica a fin de estudiar la capacidad

del mismo de presentar actividad antifúngica contra algunos patógenos de plantas, tales como *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Diaphorte* spp. y *Pythium ultimum*, entre otros.

Se observó que en ausencia de triptófano, el hidrolizado presentó una concentración de ácido indolacético del orden de 1.5 µg/ml a los 4 días de cultivo en tanto que con un contenido de 0.5 % p/v de triptófano en el medio de cultivo, esta concentración aumentó a 13.4 µg/ml. La presencia de sideróforos en el medio se determinó utilizando el reactivo de CAS, observándose que la concentración de este compuesto aumentaba al disminuir la concentración de hierro (Fe<sup>+3</sup>) presente en el medio de cultivo. El ensayo de germinación demostró que el tratamiento de las semillas de tomate con el hidrolizado incrementaba de manera estadísticamente significativa de un 75% a un 89 % de germinación a las 48 hs con respecto a un control con agua destilada. En cuanto al crecimiento de las plantas de tomate sobre soporte estéril se observó una diferencia entre las plantas control y las plantas regadas con el hidrolizado, tanto visualmente como en la determinación de peso húmedo y seco de la parte aérea y parte radicular. Entre los hongos fitopatógenos testeados, se encontró actividad fungistática contra *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma* sp y *T.harzianum*, *F. graminearum*, *Diaphorte* spp. y *Pythium ultimun*.



## **Introducción**

El uso de fertilizantes y pesticidas químicos es una práctica agrícola muy frecuente que tiene como desventaja el alto costo que significa para el agricultor y el impacto negativo sobre la salud y el medio ambiente. La disminución progresiva de su uso puede ser posible implementando tecnologías alternativas, tales como el empleo de inoculantes para su uso como biofertilizantes, fitoestimulantes o biocontroladores. Los inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo (bacteria/s u hongo/s), que tienen la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente (Sanjuan, 2007). Estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) han sido agrupados para su estudio como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y hongos promotores del crecimiento vegetal (HPCV) (Kloepper et al., 1989).

Los MPCV, en general, promueven este crecimiento a través de mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos directos se ponen de manifiesto cuando estos microorganismos sintetizan compuestos que son liberados a la rizosfera y son tomados por las plantas para su metabolismo o cuando facilitan la captura de ciertos nutrientes por parte de las plantas. Éstos incluyen la provisión de fósforo biodisponible para las plantas, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, el secuestro de hierro por medio de la síntesis de sideróforos, la reducción de niveles de etileno de las plantas y la producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquinas. Estas hormonas pueden afectar el pool hormonal endógeno de la planta modificando la morfología, la superficie y la actividad enzimática radical, como así también el crecimiento de la parte aérea. En tanto que los mecanismos indirectos están relacionados con la disminución o prevención por parte de los MPCV de los efectos deletéreos de otros microorganismos patógenos para las plantas. Incluyen la protección antibiótica contra bacterias patógenas, la reducción del hierro disponible en la rizosfera para los fitopatógenos por medio de la síntesis de sideróforos, la síntesis de enzimas que lisan la pared fúngica (proteasas, quitinasas, celulasas, etc), la competencia con organismos patógenos por los sitios de colonización de la planta y la inducción de resistencia sistémica (Glick, 1995; Gupta et al., 2000).

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Las fitohormonas son fundamentales como reguladores del desarrollo de las plantas. De acuerdo a la clasificación convencional existen cinco grupos: auxinas, giberilinas, citoquinas, etileno y ácido abscísico (Tsavkelova et al., 2006). Contribuyen a la coordinación de diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, floración, ramificación y maduración de los frutos. Son capaces de incrementar la resistencia de las plantas a factores ambientales e inducir o suprimir la expresión de genes y síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova et al., 2006). Las auxinas son responsables de la división, extensión y diferenciación de las células y los tejidos vegetales. En 1934 Kögl identificó el ácido 3-indol acético como el “elemento” responsable del crecimiento de las plantas (Kögl & Kostermans, 1934). El ácido indolacético (AIA) es una de las auxinas más importantes. Dentro de los efectos que produce, se contempla la elongación celular, el aumento de la respiración celular, la promoción del crecimiento de las raíces, el incremento en la división celular y otros factores que favorecen el desarrollo vegetal. La síntesis de esta fitohormona por parte de microorganismos y plantas se produce a través de la vía del ácido antranílico a partir del aminoácido triptófano (Trp), el cual suele ser adicionado al medio de cultivo a los efectos de aumentar la producción de esta hormona por parte de los MPCV (Balaji et al., 2012; Jeong et al., 2010; Sasirekha et al., 2012).

El fósforo -después del Nitrógeno- es el nutriente inorgánico más requerido por las plantas, es constituyente de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y moléculas involucradas en el metabolismo energético como el ATP. Su disponibilidad en el suelo representa un serio problema dado que éste se encuentra “fijo” al mismo de forma insoluble, razón por la cual suele adicionarse a los suelos como fertilizantes fosfatados. Se estima que sólo el 1% del fósforo presente en los fertilizantes es utilizado por las plantas y el porcentaje restante rápidamente es convertido en complejos insolubles como fosfato de calcio, fosfato de hierro, fosfato de aluminio, etc., haciendo que la aplicación de estos fertilizantes sea frecuente, costosa y ambientalmente poco deseable. Con el objetivo de disminuir el uso de fertilizantes inorgánicos se han realizado numerosos estudios sobre la solubilización de compuestos insolubles de fósforo por parte de ciertos microorganismos, demostrándose que la misma se lleva a cabo por medio de la producción de ácidos orgánicos, la reducción del pH, la quelación y la

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

producción de enzimas (fosfatasas). Dentro de estos microorganismos, varias especies de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* han sido reportados como solubilizadores de fósforo con potencial uso de los mismos en áreas relacionadas a la agricultura (Chun-Chao et al., 2007; Pandey et al., 2008; Richardson et al., 2009).

Las prácticas modernas para la supresión de fitopatógenos están basadas principalmente en el uso de pesticidas sintéticos. Se ha demostrado que estos pesticidas químicos causan deterioro ambiental y se incorporan en la cadena alimenticia teniendo efectos negativos en micro y macro organismos e incluso en la salud humana (Chincholkar et al., 2000). Es por esto que existe una demanda creciente de alternativas a estas prácticas de control, siendo el control biológico el que está ganando atención sobre el uso de los agentes químicos. El uso de microorganismos para el control biológico ofrece una alternativa para reducir las enfermedades de las plantas sin los efectos negativos de los pesticidas sintéticos. El control biológico involucra el uso de un microorganismo o consorcio de organismos que producen metabolitos secundarios y son capaces de inhibir a los fitopatógenos reduciendo la ocurrencia de la enfermedad vegetal. Kloepper et al. (1980) fueron los primeros en demostrar la importancia de los sideróforos en el biocontrol. La baja solubilidad del hierro en un medio acuoso aeróbico genera una gran competencia por este nutriente. Un buen agente de control biológico produce sideróforos fuertes, que son capaces de quelar el hierro presente en la rizósfera de manera competitiva y ser capaz a su vez de utilizar complejos sideróforo-hierro, limitando el acceso de los fitopatógenos a este nutriente. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular afines por el hierro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) que ejercen un papel importante sobre el control del crecimiento de hongos fitopatógenos. Se ha demostrado que los sideróforos producidos por los MPCV suelen ser más afines por el  $\text{Fe}^{+3}$  que los producidos por los hongos patógenos, dejando a estos últimos deficientes en este nutriente, limitando su crecimiento y favoreciendo el de las plantas (Adetunji et al., 2012; Bashan & Bashan, 2005).

Otro compuesto capaz de ejercer control sobre el crecimiento de fitopatógenos es el amoníaco, gas al que, sin necesidad de estar presente en altas concentraciones, se le ha atribuido la capacidad de controlar el crecimiento de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Howell et al., 1988) así como de *Sclerotium rolfsii* (Baligh et al., 1991) y de

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

*Penicillium chrysogenum* (Pavlica et al., 1978). Por último, otra alternativa que poseen los MPCV para el control de hongos patógenos, es la producción de enzimas hidrolíticas, las cuales previenen la proliferación de estos microorganismos al lisar las paredes celulares de los mismos y no las paredes de las plantas. Por ejemplo, *Pseudomonas stutzeri* produce una quitinasa extracelular y una laminarinaasa capaces de lisar las paredes del hongo patógeno *Fusarium solani* (Lim et al., 1991). Del mismo modo, *Burkholderia cepacia* produce 1,3-glucanasa y reduce la enfermedad causada por los hongos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, y *Phytophthora ultimum* (Bashan & Bashan, 2005).

Durante la última década, las investigaciones sobre la utilización de residuos orgánicos y su potencial aplicación en la agricultura han ido aumentando y en particular, el uso de los residuos de queratina en enmiendas orgánicas ha sido foco de discusión (Cabeza et al., 1998; Fuchs et al., 2008; Ros et al., 2003). La aplicación más simple de un hidrolizado de queratina o de cualquier otro residuo orgánico es como enmienda o fertilizante debido al alto contenido de nitrógeno y materia orgánica disponible. El uso de estos residuos como enmiendas orgánicas puede resultar en un suelo con mayor capacidad de resistencia frente a patógenos, reduciendo considerablemente el uso de fungicidas. Muchas de las fuentes potenciales de enmiendas orgánicas son actualmente dispuestas como residuos sólidos, tal es el caso del residuo pelo y las plumas. La utilización de este residuo para producir un hidrolizado proteico rico en nitrógeno y con ciertas características promotoras del crecimiento vegetal, ya sea por la presencia de ácido indolacético, sideróforos o enzimas hidrolíticas, no sólo reduciría los costos de vertido del mismo, sino que contribuiría al mejoramiento de los suelos a través de un manejo sustentable del medio ambiente aportando un beneficio para el sector agrícola.

## **Materiales y métodos**

### ***Obtención del hidrolizado proteico***

El extracto enzimático o hidrolizado proteico utilizado en todos los experimentos que se detallan en este capítulo se obtuvo de un cultivo de *P. lilacinum* LPSC # 876 optimizado (capítulo 4). Se utilizó residuo pelo como sustrato sin el agregado de una fuente de nitrógeno externa, con el objetivo de asegurar que el posible efecto promotor de crecimiento vegetal fuera sólo debido a los productos de degradación del residuo pelo por el hongo. El cultivo se llevó a cabo en las mismas condiciones anteriormente mencionadas (28 °C, 200 rpm, 111 h) y la biomasa se separó por centrifugación.

### ***Evaluación de la producción de ácido Indolacético por parte de P. lilacinum LPSC # 876***

Para la realización de este primer ensayo se utilizó el medio de cultivo optimizado detallado en el capítulo 4. Lo primero que se hizo fue una serie de cultivos sumergidos en los cuales se varió la concentración de Trp (0 y 0.02 % p/v). Se tomaron muestras diariamente y se determinó la concentración de AIA utilizando el reactivo de Salkowski y empleando la metodología descrita por Glickmann & Dessaux (1995). Esta técnica consiste en mezclar un volumen del sobrenadante obtenido de centrifugar las muestras de cultivo (5000 × g, 20 min, 4°C) con igual volumen de reactivo, incubar en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min y luego medir la absorbancia 530 nm. El contenido de AIA se estima utilizando una curva de calibración con AIA (Sigma) como patrón. Las determinaciones se realizaron por triplicado, realizando tanto blanco de reactivos como blanco de muestra para cada determinación.

Además de la determinación del contenido de proteínas solubles por el método de Bradford (1976), se determinó el contenido de nitrógeno presente en el sobrenadante como amoniaco espectrofotométricamente siguiendo el protocolo de Chaney & Marbach (1961).

### **Optimización de la producción de AIA**

Para el estudio de la optimización de la producción de AIA por medio de diseños estadísticos, se seleccionó el diseño experimental propuesto por Doehlert. Como se mencionó anteriormente, el método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta en el que los puntos experimentales se eligen de forma tal que queden equidistantes de un punto central. En este caso, el número de variables a estudiar fueron 3: concentración de triptófano (% p/v), concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  (mg/l) y tiempo de cultivo (días) y se realizaron un total de 15 experimentos. Se tomaron como variables dependientes a la concentración de sideróforos y de AIA.

Los experimentos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml del medio de cultivo y variando las concentraciones de Trp y  $\text{Fe}^{+3}$  tal como el diseño lo establece. A tiempos de cultivos fijos se tomó el erlenmeyer correspondiente y se procesó el cultivo separando la biomasa por centrifugación ( $5000 \times g$ , 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ). El sobrenadante de cada tiempo se utilizó para la determinación de AIA y de sideróforos.

La presencia de sideróforos se determinó mediante un ensayo líquido con el reactivo de CAS (Chrome Azurol S) siguiendo la metodología descrita por Alexander & Zuberer (1991). Brevemente esta técnica consiste en mezclar 0.250 ml del sobrenadante de cada uno de los cultivos con 0.250 ml del reactivo de CAS, dejando incubar la mezcla en resguardo de la luz durante 30 min en placas *microtiter*. La presencia de los sideróforos se puso en evidencia al cambiar el color del reactivo de CAS del azul al naranja. Se eligió aquella muestra que mostró mayor cambio de color y se realizó un barrido de longitudes de onda desde los 300 nm a los 800 nm en el lector de placas (BIORAD®), donde se observó un pico de absorción a los 402 nm aproximadamente. La concentración de sideróforos se determinó realizando las medidas a esta longitud de onda y restando los blancos de reactivos (0.250 ml de medio sin inocular + 0.250 ml de agua destilada y 0.250 ml de reactivo de CAS + 0.250 ml de agua destilada). Los resultados se expresaron como la diferencia de absorbancia entre la muestra en presencia de la solución de CAS menos los blancos respectivos ( $A-A_0$ ).

## *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

### ***Ensayo de germinación de semillas de tomate platense italiano (*Lycopersicon esculentum*)***

El ensayo de germinación de semillas de tomate platense se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto promotor del hidrolizado. Para ello, las semillas se desinfectaron superficialmente empleando hipoclorito de sodio comercial. El protocolo consistió en lavar 3 veces las semillas con agua destilada estéril, luego continuar con un lavado con hipoclorito de sodio al 20 % v/v con agitación suave (150 rpm) durante 10 minutos, finalizando con 2 lavados de 1 minuto con agua destilada estéril para eliminar el desinfectante y un último lavado de 5 minutos. Las semillas desinfectadas fueron luego sometidas al ensayo de germinación. Para ello se trataron alternativamente, por el término de una hora, tres grupos de semillas (~350 semillas) con una solución estéril del hidrolizado de pelo denominado “bajo indolacético” (2.5 µg/ml), con una solución que se denominó “alto indolacético” (5.5 µg/ml) y con agua destilada estéril (control). Luego de transcurrido el tiempo de incubación, 100 semillas de cada tratamiento fueron colocadas en cajas de Petri con agar-agua estéril. Las placas se incubaron en estufa envueltas en papel al resguardo de la luz por 3 días a 28 °C. A las 48 y 72 h de incubación se procedió a contar el número de semillas germinadas y el resultado se expresó en términos de porcentaje de germinación. Se realizaron 3 placas por tratamiento y el porcentaje de germinación se expresó como la media ± Ds. El grado de significancia estadística se determinó mediante un estudio de análisis de varianza (ANOVA)

### ***Estudio del crecimiento de las plantas de tomate a escala de invernadero***

Con el objetivo de estudiar la promoción del crecimiento vegetal del hidrolizado proteico obtenido, se llevó a cabo un estudio a nivel de invernadero. Las semillas germinadas de tomate se colocaron en macetas que contenían vermiculita (soporte inerte) estéril (1 h en autoclave a 121 °C, llevada a pH 7.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado). Se colocaron 4 semillas germinadas por maceta, utilizándose 10 macetas por tratamiento, y se llevaron a invernadero con condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperíodo de 16 h a 26 °C) hasta el final del experimento. Las plantas se regaron con los distintos tratamientos 3 veces durante un periodo de 15 días (cada 3 días). Luego del día 15, las

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

plántulas se continuaron regando con agua destilada. El ensayo duró un total de 21 días. Al cabo de ese periodo se realizó peso húmedo y peso seco de la parte aérea y la parte radicular de las plántulas.

Las soluciones de riego para los distintos tratamientos fueron:

- Tratamiento 1 (control): agua destilada
- Tratamiento 2: hidrolizado obtenido de la degradación fúngica del residuo pelo con bajo contenido de AIA (2.5 µg/ml) y un contenido de nitrógeno de 260 ppm
- Tratamiento 3: hidrolizado obtenido de la degradación fúngica del residuo pelo con alto contenido de AIA (5.5 µg/ml) y un contenido de nitrógeno de 430 ppm
- Tratamiento 4: solución de riego de Fähræus conteniendo 0.5 g/l de KNO<sub>3</sub> (equivalente a 70 ppm de nitrógeno)

El grado de significancia estadística se determinó mediante un estudio de análisis de varianza (ANOVA).

### ***Ensayo de biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos***

Con el objetivo de estudiar si el hidrolizado poseía también la capacidad de controlar hongos fitopatógenos se realizó un estudio *in vitro* que consistió en enfrentar el hidrolizado enzimático producto de la degradación del residuo pelo por parte del hongo con los distintos fitopatógenos. De esta manera se realizaron una serie placas de agar papa glucosado (PDA) conteniendo el hidrolizado proteico en su interior y placas sin este como control (sin hidrolizado). Para la obtención de las placas con el hidrolizado se procedió a esterilizar por autoclave un volumen 2x de PDA y por filtración el hidrolizado proteico de *P. lilacinum* que poseía una actividad proteolítica de 6 U azoc/ml. Una vez que el agar se enfrió lo suficiente como para no afectar la actividad proteolítica del hidrolizado, se mezclaron ambas soluciones y se plaqueó en cajas de Petri. La actividad proteolítica final del hidrolizado en la placa de Petri fue de 3 U azoc/ml. Un disco de 7 mm de cada hongo patógeno fue colocado en el centro de una caja de Petri conteniendo el hidrolizado enzimático y como control una caja de Petri con sólo PDA. Todas las cajas fueron incubadas a 28 °C por el transcurso de 7 días, evaluando el crecimiento radial dos veces por día (mañana y tarde). El ensayo para cada



### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

hongo patógeno se realizó por quintuplicado y se calculó la tasa de crecimiento radial (cm). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{crecimiento fúngico en PDA} + \text{hidrolizado} / \text{crecimiento fúngico en el control}) \times 100]$$

El grado de significancia estadística del ensayo se determinó mediante un estudio de análisis de varianza (ANOVA).

Los hongos fitopatógenos utilizados en este ensayo fueron: *Trichoderma* sp. # 38, *Fusarium graminearum* FUSKU # 117, *F. graminearum* # 206, *F. culmorum* # 29 y *Alternaria alternata* # 25031 pertenecientes al cepario de la cátedra de Microbiología de alimentos (Dpto. de Qca Orgánica de la Facultad de Cs Exactas, UBA) y *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Diaporthe* spp. y *Pythium ultimum*. El estudio de estos últimos 4 patógenos fue realizado por el Lic. José Matías Zapiola en el Laboratorio de bioinsumos fúngicos (INTA Castelar).

### ***Cultivo y mantenimiento de los hongos fitopatógenos***

Los fitopatógenos se sembraron en Erlenmeyer con 150 mL de agar malta (Britania) y se incubaron a 28 °C por siete días. Una vez observada la viabilidad de los mismos, éstos se sembraron sobre placas de agar PDA hasta su esporulación para obtener luego los discos de PDA para el ensayo. Las cepas se conservaron en tubos con agar malta inclinado bajo vaselina estéril a 4 °C.

## Resultados y discusión

### ***Evaluación de la producción de ácido indolacético por parte de *P. lilacinum* LPSC # 876***

Se encontró que la cepa *P. lilacinum* fue capaz de producir la auxina aún en ausencia de Trp (Figura 1), con un máximo de producción a los 3 días de cultivo, obteniéndose una concentración de AIA de 1.5 y 1.7  $\mu\text{g/ml}$  en ausencia y presencia de Trp, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos en cultivos de distintas bacterias promotoras de crecimiento (Tabla 1).

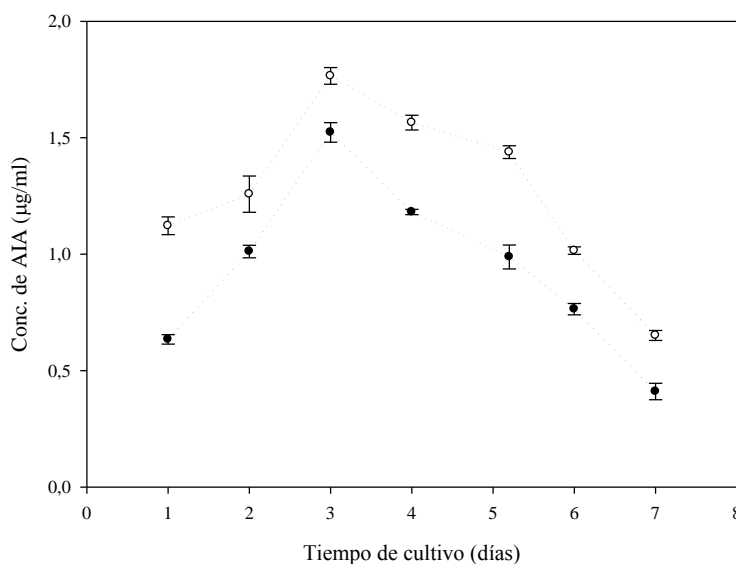


Figura 1. Producción de AIA por la cepa *P. lilacinum* en el medio optimizado en ausencia (●) y presencia de Trp (○, 0.02 % p/v).

En cuanto al contenido de nitrógeno -liberado al medio de cultivo como producto de la desaminación de péptidos y aminoácidos derivados de la degradación de la queratina-, se observó que este compuesto se incrementó de manera progresiva en el tiempo, llegando a valores de 300 ppm al cabo de 7 días.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 1. Producción de ácido indolacético (mg/ml) bajo distintas concentraciones de Trp (% p/v) por parte de *P. lilacinum* LPSC # 876 y por algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Microorganismo	Conc. de Trp en el medio (% p/v)	AIA (µg/ml)	Referencia
<i>P. lilacinum</i> LPSC # 876	0.02	1.7	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> UAP 5701	0.01	1.07	Fuentes-Ramirez et al. (1993)
<i>G. diazotrophicus</i> UAP 7308	0.01	1.12	Fuentes-Ramirez et al. (1993)
<i>Azospirillum brasilense</i> CBG	0.1	0.75	Hernández-Mendoza et al. (2008)
<i>G. diazotrophicus</i> 4-02	0.01	1.8	Rodríguez Cheang et al. (2005)
<i>G. diazotrophicus</i> PAI-5	0.01	2.2	Rodríguez Cheang et al. (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AK-1	0.01	4.0	Karnwal (2009)

***Optimización de la producción de AIA***

Con el objetivo de optimizar estadísticamente la producción de AIA por *P. lilacinum* se escogió el diseño experimental de Doehlert. Este diseño permite describir una región en torno a una respuesta óptima y contiene  $n^2 + n + 1$  puntos para las  $n$  variables. Para el estudio del efecto de tres variables, se necesita un conjunto de 13 experiencias y, en este caso, una de las propiedades del diseño es la distribución uniforme de los experimentos en el espacio tridimensional (Figura 2). 12 experimentos serán equidistantes de un experimento central que tiene los valores codificados (0, 0, 0) y se distribuyen en una esfera de radio 1 (Figura 2). El experimento central se realiza por triplicado para determinar la varianza propia del diseño.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

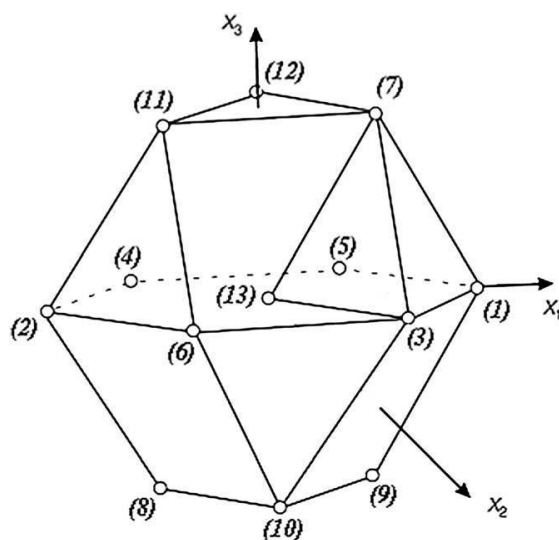


Figura 2. Cubo-octaedro donde se muestra la ubicación de los 13 puntos experimentales para las 3 variables codificadas ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) en el diseño experimental de Doehlert. A lo largo del eje  $x_3$ , en la porción del medio ( $x_3 = 0$ ), se encuentran 6 experimentos en los vértices (1, 2, 3, 4, 5, y 6) y uno en el centro (13) de un hexágono. Por otra parte, tres experimentos (7, 11, y 12) se encuentran en la porción superior y otros tres en la porción inferior (8, 9, y 10)

Una de las ventajas que presenta este diseño sobre el diseño compuesto central rotatable (CCD) es la posibilidad de extender el espacio muestral mediante la adición de otra variable o desplazar el diseño hacia un nuevo espacio muestral. En este trabajo, las 3 variables evaluadas fueron: concentración de triptófano (% p/v), concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  (mg/l) y tiempo de cultivo (días), con un espacio muestral definido entre 0-0.2 % p/v para la concentración de Trp, 1.2-2.0 mg/l para la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  y 1-7 días para la variable tiempo y un valor central (nivel cero) definido como 0.1 % p/v de Trp, 1.6 mg/l de  $\text{Fe}^{+3}$  y 4 días. Además de estudiar la concentración de AIA ( $\mu\text{g/ml}$ ) como variable dependiente, también se estudió con este diseño la producción de sideróforos (A-A<sub>0</sub>). En la tabla 2 se presenta la matriz del diseño experimental con los valores reales y codificados de las variables independientes ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) y el valor de la variable dependiente (Concentración de AIA).

El análisis estadístico de los resultados mediante un análisis múltiple basado en el método de cuadrados mínimos permitió obtener un polinomio de segundo orden que refleja cómo afectan los efectos lineales y cuadráticos así como las distintas

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

interacciones de los mismos sobre la producción de AIA. Así, el polinomio obtenido que describe la influencia de cada variable y sus interacciones sobre la producción de AIA es:

$$AIA (\mu\text{g/ml}) = 3.24 + 1.73x_1 - 0.37x_2 - 0.43x_3 - 0.34x_1^2 - 1.04x_2^2 - 0.95x_3^2 + 0.46x_1x_2 + 0.17x_1x_3 + 0.71x_2x_3$$

donde  $x_1$  es la concentración de triptófano en % p/v,  $x_2$  es el tiempo de cultivo expresado en días y  $x_3$  es la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  en mg/l.

Para determinar el nivel de significancia de las distintas variables estudiadas se realizó el análisis de varianza con la respectiva prueba F. En este estudio se tomó como valor de significancia  $p < 0.05$ , es decir, los coeficientes con un nivel de confianza superior al 95 % se consideraron estadísticamente significativos. El análisis de varianza se presenta en la tabla de ANOVA (Tabla 3) e indica que las 3 variables estudiadas: concentración de Trp ( $x_1$ ), tiempo de cultivo ( $x_2$ ) y concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  ( $x_3$ ) tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de AIA, así como lo tienen los términos cuadráticos  $x_2^2$  y  $x_3^2$ . Sin embargo, ninguno de los términos que indican interacciones lineales entre las variables estudiadas resultó estadísticamente significativo en la producción de la auxina. El coeficiente de correlación múltiple  $r^2$  para la producción AIA por parte del hongo *P. lilacinum* fue de 0.973.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 2. Matriz experimental obtenido al aplicar el diseño de Doehlert para 3 variables. Se muestran los valores codificados y reales para cada corrida, así como también el valor de la variable dependiente.

Corrida	Valores codificados			Valores reales			
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Trp (% p/v)	Tiempo (días)	Fe (mg/l)	AIA ( $\mu\text{g/l}$ )
8	-0.5	-0.289	-0.816	0.05	3	1.2	2.6
10	0	0.577	-0.816	0.1	6	1.2	2.0
9	0.5	-0.289	-0.816	0.15	3	1.2	3.7
2	-1	0	0	0	4	1.6	1.0
4	-0.5	-0.866	0	0.05	1	1.6	2.0
6	-0.5	0.866	0	0.05	7	1.6	1.1
13	0	0	0	0.1	4	1.6	3.5
13	0	0	0	0.1	4	1.6	3.3
13	0	0	0	0.1	4	1.6	2.9
3	0.5	0.866	0	0.15	7	1.6	3.1
5	0.5	-0.866	0	0.15	1	1.6	3.2
1	1	0	0	0.2	4	1.6	4.9
11	-0.5	0.289	0.816	0.05	5	2	1.2
12	0	-0.577	0.816	0.1	2	2	1.9
7	0.5	0.289	0.816	0.15	5	2	2.9

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para la producción de AIA por *P. lilacinum*. Se muestra además el grado de significancia de cada coeficiente ( $p < 0.05$ ). Donde SS: suma de los cuadrados; df: grados de libertad; MS: suma de los cuadrados y *F-value*: Número de Fisher

	SS	df	MS	F-value	p-value
$x_1$	11.9368	1	11.9368	135.21	0.0001
$x_1^2$	0.138535	1	0.138535	1.57	0.2657
$x_2$	0.54631	1	0.54631	6.19	0.0503
$x_2^2$	1.30299	1	1.30299	14.76	0.0121
$x_3$	0.806078	1	0.806078	9.13	0.0294
$x_3^2$	1.20868	1	1.20868	13.69	0.0140
$x_1x_2$	0.162448	1	0.162448	1.84	0.2330
$x_1x_3$	0.01758	1	0.01758	0.20	0.6741
$x_2x_3$	0.303618	1	0.303618	3.44	0.1228
Lack of Fit	0.286629	3	0.0955429	1.23	0.4768
Pure Error	0.441431	2	0.0882862		
Total SS	16.489	14			

Con el fin de determinar las condiciones óptimas que maximicen la producción de AIA se obtuvieron las distintas superficies de respuestas, en las cuales una de las variables estudiadas se fijó arbitrariamente en el nivel central, mientras que las otras dos variaban. En la Figura 3 A, se presenta la superficie de respuesta obtenida para la producción de la auxina en términos de la variación de la concentración de Trp y el tiempo de cultivo. La máxima producción de esta auxina se produce alrededor del día 4 (108 h de cultivo) en presencia de 0.2 % p/v de Trp. Se observa, además que a medida que la concentración de Trp aumenta, la producción de AIA aumenta, lo que sugiere que *P. lilacinum* utiliza este aminoácido sólo para producir AIA tal como lo sugieren Hernández-Mendoza et al. (2008) en el estudio de la biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *A. brasilense* nativa de Tamaulipas.

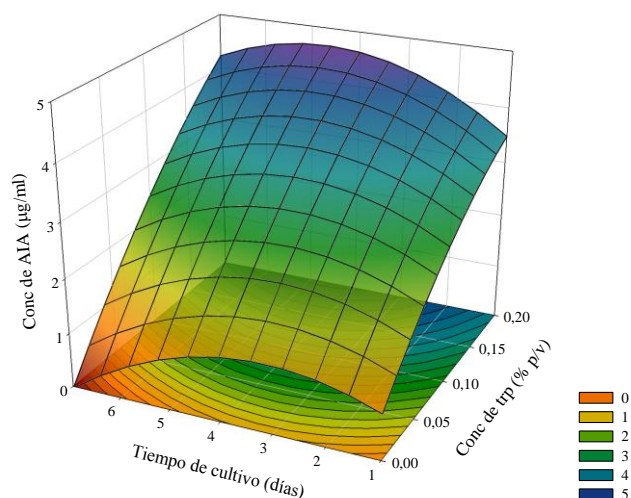


Figura 3 A. Efecto del tiempo de cultivo y la concentración de triptófano sobre la producción de AIA por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado. La superficie de respuesta obtenida surge de representar el polinomio en el universo elegido por un diseño de superficie de respuesta de Doehlert

Un comportamiento similar se obtuvo al mantener constante el tiempo de cultivo y graficar la superficie de respuesta como producto de la variación de la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  (mg/l) y de Trp (% p/v) (Figura 3B). Así, al 4to día de cultivo, la máxima concentración de AIA se obtiene con la máxima concentración de Trp en el medio de cultivo y una concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  en el rango de 1.4-1.6 mg/l.

Por último, se observa (Figura 3C) que al mantener la concentración de Trp fija en el nivel superior (0.2 % p/v) se observa que a medida que la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  disminuye y el tiempo aumenta la concentración de AIA aumenta; encontrándose la máxima producción de esta auxina (~ 4.7  $\mu\text{g/ml}$ ) en un rango de concentraciones de  $\text{Fe}^{+3}$  de entre 1.4-1.6 mg/l y entre las 84 – 125 h de cultivo.



*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

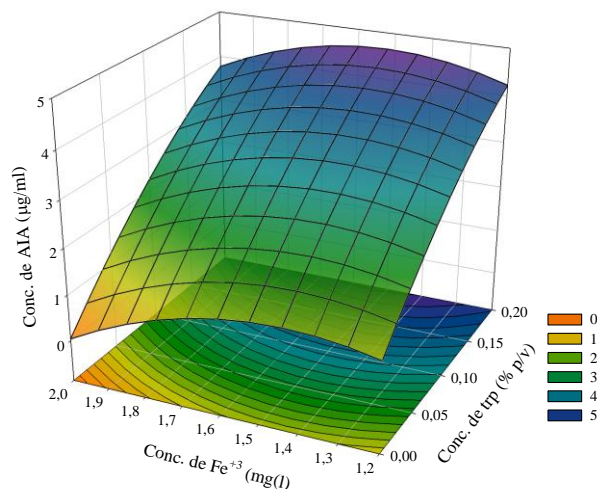


Figura 3 B. Efecto de la concentración de  $Fe^{+3}$  (mg/l) y la concentración de triptófano sobre la producción de AIA por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado

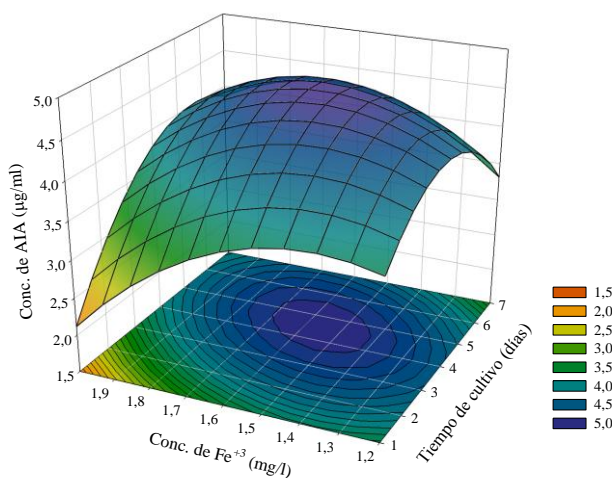


Figura 3 C. Efecto de la concentración de  $Fe^{+3}$  (mg/l) y el tiempo de cultivo sobre la producción de AIA por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado

Se observa en todas las superficies de respuesta, así como también en la Figura 1 que luego de llegar a un máximo de producción de AIA, la concentración de esta auxina comienza a descender lentamente. Esta disminución en la concentración puede deberse a la producción por parte del hongo de enzimas degradadoras de AIA, tales como AIA

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

oxidasa o peroxidasa (Datta & Base, 2000). Este comportamiento es similar al observado en cultivos de varios aislamientos de *Rhizobium* sp., *R. legumionsarum* bv. *phaseoli* y *R. legumionsarum*. En todos los casos, el AIA comenzó a ser detectado en el medio de cultivo luego de 12 h, con un incremento progresivo hasta las 72 h para luego declinar rápidamente (Gosh & Basu, 2002)

Del análisis matemático del polinomio que describe la influencia de cada una de las variables y sus interacciones sobre la producción de AIA se obtuvieron los valores óptimos de cada una de ellas a fin de obtener la condición de cultivo en la cual se obtuviera un máximo valor de producción de AIA. Así, el modelo desarrollado predice que la máxima producción de la auxina ( $\mu\text{g/ml}$ ) se alcanza con un medio cuya composición sea la siguiente (por litro): 10 g residuo pelo, 0.496 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.486 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.00172 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0013 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0.0010 g  $\text{MgCl}_2$ , y 0.0065 mg  $\text{CaCl}_2$ , 7.10 g de glucosa y 4 g de triptófano (pH 5.6,  $2 \times 10^7$  conidios/ml), 200 rpm, 28 °C y 6.3 días de cultivo. Si la concentración de triptófano se mantiene en un valor de 0.2 % p/v, la máxima concentración de AIA en el cultivo optimizado se obtiene con una concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  de 1.6 mg/l y 4.2 días de cultivo.

Dado que una de las variables optimizadas (concentración de triptófano) presentaba su valor óptimo para la producción de ácido indolacético por fuera del universo estudiado (0.4 % p/v), se decidió realizar una nueva experiencia utilizando el mismo diseño estadístico de Doehlert, pero desplazando las variables de estudio (concentración de triptófano y tiempo de cultivo) hacia un nuevo espacio muestral. En el nuevo diseño el espacio muestral se definió entre 0-0.5 % p/v para la concentración de Trp, 1.2-2.0 mg/l para la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  y 2-20 días para la variable tiempo, siendo el valor central (nivel cero) para este nuevo diseño 0.25 % p/v de Trp, 1.6 mg/l de  $\text{Fe}^{+3}$  y 8 días. La nueva matriz del diseño experimental con los respectivos valores reales y codificados de las variables independientes ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) y el valor de la variable dependiente (Concentración de AIA y de sideróforos) se presentan en la tabla 4.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 4. Matriz experimental obtenido al aplicar el diseño de Doehlert para 3 variables. Se muestran los valores codificados y reales para cada corrida, así como también el valor de la variable dependiente. Donde  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  son las variables concentración de triptófano (% p/v), tiempo de cultivo (días) y concentración de  $Fe^{+3}$  (mg/l)

Corrida	Valores codificados			Valores reales			AIA ( $\mu\text{g/l}$ )	Sideróforos
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Trp (% p/v)	Tiempo (días)	Fe (mg/l)		
8	-0.5	-0.289	-0.816	0.13	8	1.2	6.3	0.628
10	0	0.577	-0.816	0.25	17	1.2	6.1	0.773
9	0.5	-0.289	-0.816	0.38	8	1.2	11.2	0.804
2	-1	0	0	0.0	11	1.6	2.3	0.445
4	-0.5	-0.866	0	0.13	2	1.6	5.8	0.336
6	-0.5	0.866	0	0.13	20	1.6	3.8	0.678
13	0	0	0	0.25	11	1.6	9.0	0.647
13	0	0	0	0.25	11	1.6	9.8	0.693
13	0	0	0	0.25	11	1.6	9.3	0.746
3	0.5	0.866	0	0.38	20	1.6	11.2	0.987
5	0.5	-0.866	0	0.38	2	1.6	10.8	0.532
1	1	0	0	0.50	11	1.6	13.4	0.856
11	-0.5	0.289	0.816	0.13	14	2	4.6	0.648
12	0	-0.577	0.816	0.25	5	2	6.8	0.642
7	0.5	0.289	0.816	0.38	14	2	9.9	0.775

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

El polinomio que describe la influencia de cada variable y sus interacciones sobre la producción de la auxina -obtenido del análisis estadístico los resultados- fue el siguiente:

$$AIA (\mu g/ml) = 9.39 + 5.50x_1 - 0.75x_2 - 0.59x_3 - 1.54x_1^2 - 1.54x_2^2 - 1.90x_3^2 + 1.33x_1x_2 + 0.15x_1x_3 + 2.36x_2x_3$$

Con un coeficiente de correlación múltiple  $r^2$  de 0.986. Del análisis de regresión múltiple se observa que, tanto la concentración de Trp como el tiempo de cultivo ( $x_1$  y  $x_2$ ) poseen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de AIA. También lo poseen los términos cuadráticos  $x_1^2$ ,  $x_2^2$  y  $x_3^2$  y las interacciones lineales entre la concentración de  $Fe^{+3}$  y el tiempo de cultivo ( $x_2x_3$ ) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para la producción de AIA por parte de *P. lilacinum*.. Se muestra el grado de significancia de cada coeficiente ( $p < 0.05$ ). Donde SS: suma de los cuadrados; df: grados de libertad; MS: suma de los cuadrados y *F-value*: Número de Fisher

	SS	df	MS	F-value	p-value
$x_1$	121.11	1	121.11	744.89	0.001
$x_1^2$	2.85677	1	2.85677	17.57	0.05025
$x_2$	2.28787	1	2.28787	17.07	0.050
$x_2^2$	2.84276	1	2.84276	17.48	0.0527
$x_3$	1.4066	1	1.4066	8.65	0.0988
$x_3^2$	4.81632	1	4.81632	29.62	0.0321
$x_1x_2$	1.3413	1	1.3413	8.25	0.1029
$x_1x_3$	0.01405	1	0.01405	0.09	0.7964
$x_2x_3$	3.35439	1	3.35439	20.63	0.0452
Lack of Fit	1.49855	3	0.499515	3.07	0.2552
Pure Error	0.325178	2	0.162589		
Total SS	138.756	14			

Del análisis de las superficies de respuestas obtenidas en estas nuevas condiciones se pudo observar que manteniendo la concentración de  $Fe^{+3}$  en el nivel central (1.6 mg/l), la concentración de ácido indolacético aumenta a medida que

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

aumenta la concentración de Trp en el medio de cultivo. En cuanto al tiempo de cultivo, ya al segundo día, la auxina comienza a ser detectada alcanzando un máximo valor entre los 10 y 16 días (Figura 4 A). Comparando este resultado con el obtenido anteriormente (Figura 3A), se observa que ambos comparten la misma tendencia en cuanto a la concentración de Trp agregado al medio, es decir a mayor concentración de Trp, mayor concentración de auxina producida por parte del hongo, sin embargo en este nuevo diseño el rango de tiempo de cultivo dentro del cual se puede encontrar la auxina en su máxima concentración es mayor. El hecho de que al aumentar la concentración de Trp la mayor concentración de auxina se detecte tiempo más tarde confirma que *P. lilacinum* utiliza este aminoácido sólo para producir AIA.

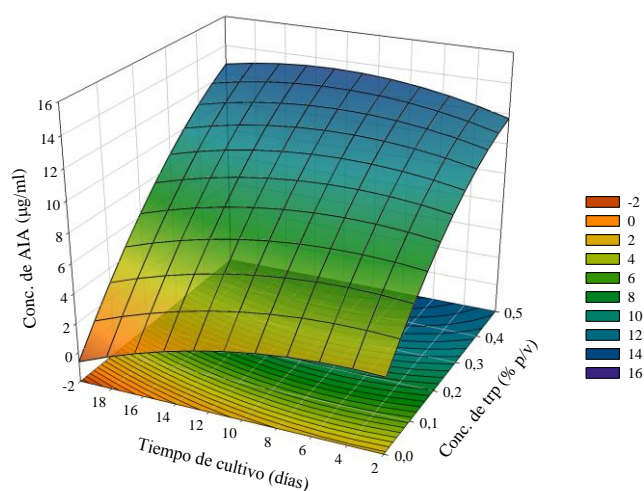


Figura 4 A. Efecto del tiempo de cultivo y la concentración de triptófano sobre la producción de AIA por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado manteniendo la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  en el nivel central (1.6 mg/l)

Al mantener la variable concentración de triptófano fija en su máximo nivel (0.5 % p/v) se observa que la máxima producción de esta fitohormona ocurre cuando la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  varía entre 1.4 y 1.8 mg/l con un tiempo de cultivo que va entre los 8 y 18 días, dependiendo de la concentración de metal utilizada. Por ejemplo, si el medio de cultivo presenta una concentración de Trp de 0.5 % p/v y una concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  de 1.4 mg/l, la máxima producción se comenzará a detectar al cabo de 8.4 días y hasta los 10.5 días de cultivo.

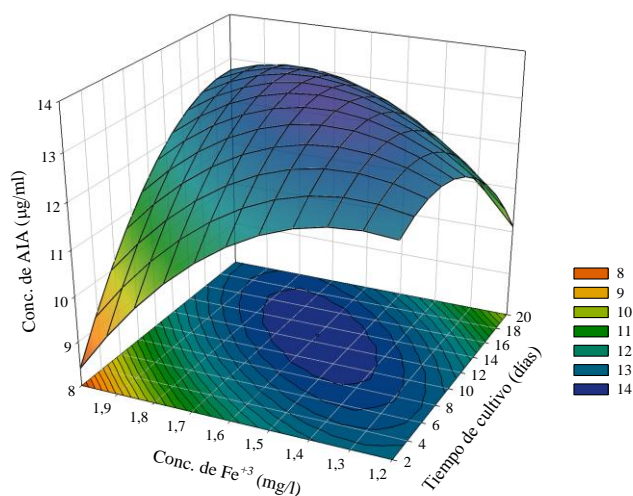


Figura 4 B. Efecto del tiempo de cultivo y la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  sobre la producción de AIA por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado con una concentración de Trp en el nivel superior (0.5 % p/v)

A medida que aumenta la concentración de triptófano en el medio de cultivo aumenta de manera proporcional la concentración de ácido indolacético producido por el hongo, a su vez este aumento trae aparejado también un aumento en el tiempo de cultivo, es así que se llega a una situación de compromiso donde se debe evaluar el objetivo de la optimización del cultivo. En este caso, con una concentración de Trp de 0.5 % p/v y de  $\text{Fe}^{+3}$  de 1.45 mg/l, al término de 8 días de cultivo se obtienen 13.5  $\mu\text{g/ml}$  de esta auxina.

Balaji et al. (2012) en un estudio de optimización del medio de cultivo para la producción de esta auxina por especies de *Pseudomonas* sp. encontraron que la mayor concentración de AIA se obtiene cuando el medio de cultivo se suplementaba con glicerol como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno y una concentración de triptófano de 0.5 % p/v, en tanto que, para especies de *Rhizobium* sp. aisladas de raíces y nódulos de *Sesbania procumbens* la máxima producción se obtiene en medios con glucosa como fuente de carbono y con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, con una concentración de 0.3 % p/v de triptófano (Sasirekha et al., 2012). En ambos trabajos, la concentración de AIA se incrementó en 4.0 y 2.4 veces, respectivamente, en

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

tanto que en este trabajo se llegó a incrementar la producción de la auxina en 5.8 veces con respecto al cultivo en ausencia de Trp.

La concentración de AIA producida por *P. lilacinum* creciendo en presencia de 0.5 % p/v de triptófano es del orden de las obtenidas por microorganismos reconocidos como promotores de crecimiento vegetal tales como aislados de *Azotobacter* spp. Estos microorganismos, en presencia de 0.5 % p/v de triptófano son capaces de producir entre 7.30-32.8 µg/ml de AIA (de acuerdo al aislamiento) luego de 15 días de incubación (Ahmad et al., 2005). Sridevi & Mallaiah (2007) reportan para distintas cepas de *Rhizobium* sp. una producción máxima de 3.2, 4.0, 11.6 y 11.8 µg/ml de AIA en presencia de 0.3 % p/v de Trp, respectivamente. *Streptomyces* CMU-K204, luego de 7 días de incubación y en presencia de 0.2 % p/v de triptófano produce 11.65 µg/ml de AIA.

Utilizando el mismo diseño experimental de Doehlert presentado en la Tabla 3, se realizó el estudio y optimización de la producción de sideróforos por parte de *P. lilacinum*. La presencia de sideróforos se determinó mediante un ensayo líquido con el reactivo de CAS y los resultados se expresaron como la diferencia de absorbancia entre la muestra en presencia de la solución de CAS menos los blancos respectivos (A-A<sub>0</sub>). Los resultados obtenidos en cada experimento se muestran en la Tabla 4.

El análisis estadístico de los resultados permitió obtener un polinomio de segundo orden que refleja cómo los efectos lineales y cuadráticos así como las distintas interacciones de los mismos afectan la síntesis de sideróforos. El polinomio obtenido que describe la influencia de cada variable y sus interacciones sobre la producción de este compuesto es:

$$\text{Sideróforos} = 0.696 + 0.203x_1 + 0.190x_2 - 0.029x_3 - 0.045x_1^2 - 0.069x_2^2 + 0.052x_3^2 + 0.065x_1x_2 - 0.054x_1x_3 - 0.00038x_2x_3$$

Donde  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  son las variables concentración de triptófano (% p/v), tiempo de cultivo (días) y concentración de Fe<sup>+3</sup> (mg/l), respectivamente. El análisis estadístico del estudio de optimización de la producción de sideróforos se presenta en la tabla de ANOVA (Tabla 6). Se encontró que de las tres variables estudiadas, sólo la concentración de triptófano ( $x_1$ , % p/v) y el tiempo de cultivo ( $x_2$ ) poseen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de este compuesto, en tanto que ni la

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

concentración de  $Fe^{+3}$  ni las diferentes interacciones de las variables o sus respectivos términos cuadráticos resultaron ser estadísticamente significativos (Tabla 6). El coeficiente de correlación múltiple  $r^2$  fue de 0.921.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA). Identificación de las variables significativas para la producción de sideróforos por *P. lilacinum* Se muestra además el grado de significancia de cada coeficiente ( $p < 0.05$ ). Donde *SS*: suma de los cuadrados; *df*: grados de libertad; *MS*: suma de los cuadrados y *F-value*: Número de Fisher

	SS	df	MS	F-value	p-value
$x_1$	0.165537	1	0.165537	67.87	0.0144
$x_1^2$	0.002442	1	0.002442	1.00	0.4222
$x_2$	0.145408	1	0.145408	59.61	0.0164
$x_2^2$	0.005672	1	0.005672	2.33	0.2668
$x_3$	0.003375	1	0.003375	1.38	0.3605
$x_3^2$	0.003659	1	0.003659	1.50	0.2436
$x_1x_2$	0.003156	1	0.003156	1.29	0.3732
$x_1x_3$	0.001756	1	0.001756	0.72	0.4854
$x_2x_3$	8,90E-04	1	8,90E-04	0.0	0.9957
Lack of Fit	0.02384	3	0.007947	3.26	0.2436
Pure Error	0.00487	2	0.002439		
Total SS	0.3645	14			

En la Figura 5 A se presenta la superficie de respuesta obtenida para la variable dependiente (producción de sideróforos) como resultado de la interacción entre la concentración de  $Fe^{+3}$  (mg/l) y el tiempo de cultivo (días), manteniendo la concentración de triptófano en el nivel superior (0.5 % p/v). Se fija la concentración de triptófano en el nivel superior porque es en esa condición donde se obtiene la máxima concentración de AIA. Se puede observar que la producción de sideróforos aumenta al aumentar el tiempo de incubación y disminuir la concentración de hierro en el medio. La producción de sideróforos está relacionada con condiciones de hierro limitante y se considera como un componente importante de la maquinaria de un microorganismo para supervivencia del mismo en suelos deficientes de hierro soluble (Khan et al., 2006). Si se mantiene fija la concentración de  $Fe^{+3}$  en el nivel inferior (1.2 mg/l) se puede observar que,



*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

nuevamente, la mayor concentración de sideróforos se obtiene en condiciones de máxima concentración de triptófano y al máximo tiempo de cultivo (Figura 5 B).

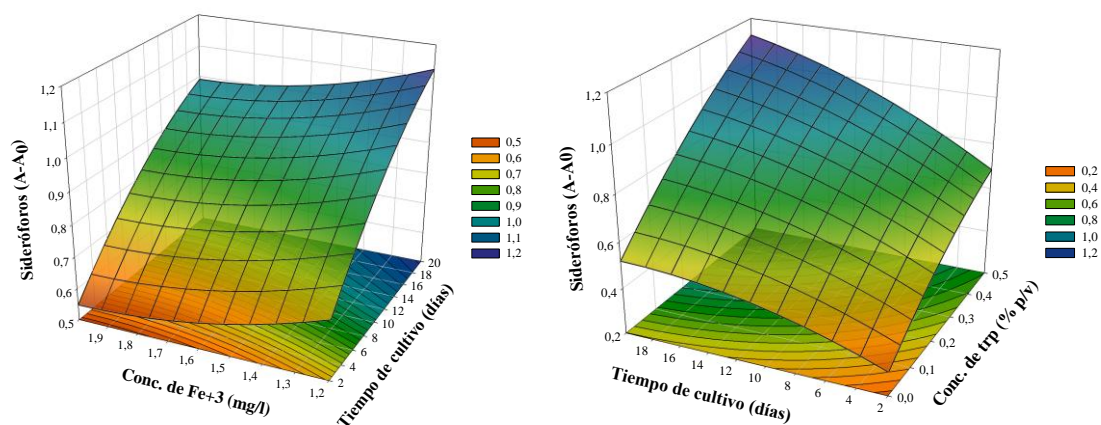


Figura 4 A). Efecto del tiempo de cultivo y la concentración de Fe<sup>+3</sup> sobre la producción de sideróforos por parte de *P. lilacinum* creciendo en el medio de cultivo optimizado con una concentración de Trp en el nivel superior (0.5 % p/v). B) Efecto del tiempo de cultivo y la concentración de trp sobre la producción de sideróforos en el medio de cultivo optimizado con una concentración de Fe<sup>+3</sup> en el nivel inferior (1.2 mg/l)

Varios estudios sugieren que la producción de sideróforos depende no sólo de la concentración de hierro en el medio, sino también de la composición del medio donde el microorganismo crece. Mackie & Birbeck (1992) demostraron que *Vibrio anguillarum* produce un tipo de sideróforos (fenolatos) en 3 medios estudiados, en tanto que sideróforos del tipo hidroximato sólo son producidos en un medio con Tris-Succinato. En tanto que, L. Gram (1996) demostró que ciertos aislados de *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas* sp. dieron un resultado negativo cuando se testearon utilizando CAS-agar y sin embargo, cuando fueron crecidas en medios más ricos (con agregado de harina de pescado), pero deficientes en Fe<sup>+3</sup>, produjeron sideróforos. El hecho de que sustratos proteicos como la harina de pescado resulte excelente para la producción de este compuesto está relacionado con que la síntesis de sideróforos requiere de esqueletos peptídicos a los cuales unir los grupos quelantes y, dependiendo de la capacidad de síntesis del microorganismo, puede incluso ser necesario algún aminoácido que puede ser proporcionado por el sustrato al ser éste degradado por el

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

microorganismo (Gram, 1996). Esta explicación se ajusta correctamente a la situación planteada en esta tesis, donde se utiliza un sustrato proteico como lo es el residuo pelo, observándose que *P. lilacinum* en condiciones de baja concentración de  $Fe^{+3}$  y alta concentración de Trp no sólo es capaz de producir una concentración de AIA similar a los reportados por microorganismos promotores de crecimiento vegetal, sino que es también capaz de producir sideróforos, ambos compuestos importantes desde el punto de vista de la promoción de crecimiento vegetal.

### ***Ensayo de germinación de semillas de tomate platense italiano (*Lycopersicum esculentum*)***

Los resultados de la evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal a través de la tasa de germinación de semillas de tomate se muestran en la Tabla 7. Se observa que a las 48 h de incubación el porcentaje de germinación de las semillas tratadas con el hidrolizado es mayor que el control y esa diferencia resulta estadísticamente significativa, sin embargo, al realizar el análisis de varianza para los dos tratamientos con el extracto proteico, no se encontró que la diferencia en el porcentaje de germinación fuera significativa ( $p > 0.05$ ). Lo mismo sucedió luego de las 72 h de incubación donde nuevamente la diferencia entre el control y ambos grupos resultó ser significativa. Lo que demuestra que el tratamiento de las semillas con el hidrolizado proteico incrementa el porcentaje de germinación y no necesariamente este aumento se deba a la presencia de la fitohormona AIA. En la Tabla 8 se muestra el análisis de ANOVA para las 48 h de incubación. Por diferencia de medias se arman grupos homogéneos expresados con una X. El método para discriminar una diferencia de medias estadísticamente significativa fue LSD (*Fisher's least significant difference*). Con este método hay un riesgo del 5 % de decir que las medias son estadísticamente significativas cuando no lo son. El número 1 corresponde al control en tanto que el 2 y 3 corresponden al tratamiento bajo y alto indolacético, respectivamente.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 7. Efecto del hidrolizado proteico sobre la germinación de semillas de tomate

	Control	Bajo Indolacético	Alto Indolacético
48 h de incubación	71.3 ± 4.7	79.0 ± 3.5	78.7 ± 2.0
72 h de incubación	79.0 ± 1,0	84.7 ± 2.1	83.0 ± 1.0

Tabla 8. Análisis de varianza para el ensayo de germinación luego de 48 h de incubación

Multiple Range Tests for Col\_2 by Col\_1

Method: 95,0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	71,3333	X
3	3	78,6667	X
2	3	79,0	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-7,66667	6,79156
1 - 3	*-7,33333	6,79156
2 - 3	0,333333	6,79156

\* denotes a statistically significant difference.

Estudios de germinación utilizando hidrolizados biológicos de plumas han sido reportados por Sivakumar et al. (2012) y por Gousterova et al. (2012). Estos autores utilizan semillas de arroz y de Ryegrass (césped Lolium), respectivamente, y en ambos casos se reporta un incremento en la tasa de germinación de las semillas cuando son tratadas con el hidrolizado. Similares resultados fueron obtenidos por Nustorova et al. (2006) al utilizar un hidrolizado de lana obtenido por tratamiento químico. Todos estos autores adjudican el incremento en la tasa de germinación a la presencia en el hidrolizado de compuestos nitrogenados, metabolitos orgánicos, etc. Gousterova et al. (2012) asimismo reportan que un aumento en la cantidad de hidrolizado utilizado puede llevar a un efecto adverso en la germinación, inhibiendo incluso la misma.

***Estudio del crecimiento de las plantas de tomate a escala de invernadero***

Con el objetivo de estudiar el efecto del hidrolizado proteico sobre el crecimiento de plantas de tomate se realizaron ensayos con un total de 132 plantas a escala de invernadero (Figura 5).

## *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*



Figura 5. Plantas de tomate platense italiano (*Lycopersicum esculentum*) creciendo a escala de invernadero (macetas con vermiculita estéril). Las plantas se rotaban de lugar cada 3 días.

Al analizar los datos de peso húmedo y peso seco, se observó que en relación a la parte aérea de la planta, ésta se desarrolló más con el tratamiento 4 (solución de Fähræus). Sin embargo, la diferencia entre el tratamiento 3 y 4 fue a nivel del desarrollo de los tallos, con el tratamiento 4 las plantas eran más altas que con el tratamiento 3. En tanto que entre el tratamiento 2 y 3, las plantas regadas con la solución del tratamiento 2 resultaron ser menores en tamaño tanto en altura como tamaño de las hojas (Figura 6). Esto también se vio reflejado en el peso seco de la parte aérea. La diferencia entre el tratamiento 2 y 3 no sólo reside en el contenido de AIA, sino también en el contenido de nitrógeno que presentan. Se sabe que el nitrógeno tiene incidencia en el desarrollo vegetativo aéreo de las plantas de tomate. Mohamed et al. (1987) detectaron aumentos en los contenidos de aminoácidos libres, clorofila, proteínas y actividad fotosintética en las hojas de plantas de tomate a medida que las dosis nitrogenadas se hicieron mayores, mientras que Batista & Felipe (1990) observaron incrementos en el peso seco foliar, área foliar/planta y área foliar/m<sup>2</sup> con dosis por encima de los 100 g de N/m<sup>2</sup> en condiciones de invernadero. Este aumento en la parte aérea de la planta fue evidente a lo largo de todo el experimento tal como lo demuestran las Figuras 6 (A-U). Se observó además que, en todo el tiempo que duró la experiencia,

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

las plantas de tomate tratadas con la solución 3 presentaban una coloración más intensa y a los 21 días de cultivo se observó que tanto las plantas del tratamiento 1 como las del tratamiento 2 y 4 presentaban sus hojas con una coloración verde pálido y amarillo, evidenciando falta de nitrógeno.

En cuanto a la parte radicular de las plantas, el tratamiento 2 presentó diferencia significativa con el tratamiento 4, pero no con el tratamiento 3 ( $p < 0.05$ ) y a su vez no hubo diferencia significativa entre el tratamiento 3 y 4. Cuando se analizaron los respectivos pesos secos se observó que la diferencia entre los tratamientos 2 y 4 eran estadísticamente significativos, así como entre los tratamientos 2 y 3, en tanto que entre el tratamiento 3 y 4 no lo era (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Efecto del hidrolizado proteico obtenido de la degradación de residuo pelo por parte de *P. lilacinum* en el crecimiento de las plantas de tomate. Los valores se dan como la media del peso de 40 plantas para cada tratamiento con su desviación estándar.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Parte aérea (peso húmedo, g)	0.032 ± 0.01	0.532 ± 0.03	0.775 ± 0.09	1.01 ± 0.07
Raíz (peso húmedo, g)	0.014 ± 0.005	0.260 ± 0.05	0.253 ± 0.05	0.242 ± 0.02
Parte aérea (peso seco, g)	0.006 ± 0.002	0.058 ± 0.0004	0.092 ± 0.013	0.110 ± 0.009
Raíz (peso seco, g)	0.007 ± 0.002	0.033 ± 0.0007	0.052 ± 0.009	0.049 ± 0.005

Tabla 10. Análisis de varianza para el peso seco de la raíz de las plantas de tomate con distintos tratamientos.

Multiple Range Tests for Col\_2 by Col\_1

---

Method: 95,0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	10	0,0282	X
2	10	0,1259	X
4	10	0,1879	X
3	10	0,2093	X

---

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-0,0977	0,023341
1 - 3	*-0,1811	0,023341
1 - 4	*-0,1597	0,023341
2 - 3	*-0,0834	0,023341
2 - 4	*-0,062	0,023341
3 - 4	0,0214	0,023341

---

\* denotes a statistically significant difference.

### *Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

La diferencia de peso seco entre el tratamiento 2 y 3 puede atribuirse a una menor cantidad de AIA presente en la solución, haciendo que haya un menor desarrollo radicular dado que el AIA está relacionado con el desarrollo de pelos radiculares (Patil et al., 2011; Patten & Glick, 2002).

Se puede concluir entonces que el efecto observado sobre el crecimiento de las plantas de tomate utilizando el hidrolizado proteico con alto contenido de AIA (5.5 µg/ml) y un contenido de nitrógeno de 430 ppm es comparable al obtenido con la solución de referencia (sol. de riego de Fähræus) haciendo así posible su uso como fertilizante orgánico. Como ventaja adicional a la solución de riego el hidrolizado demostró tener la capacidad de aumentar el volumen radicular de la planta, y este aumento en el desarrollo radical conduciría a un incremento en la adquisición de sustancias nutritivas y agua.

Hidrolizados proteicos obtenidos a partir de plumas han arrojado resultados similares a los que se presentan en esta tesis. Kim et al. (2004) reportaron efectos similares al fertilizante comercial, no encontrando diferencia significativa en el peso seco de ninguna de las partes de las plantas de lechuga o tomate. Adetunji et al. (2012) en su ensayo con plantas de frijol chino (*Vigna unguiculata*) observa resultados al analizar los pesos secos de distintos tratamientos de las plantas con respecto al control. Los tratamiento consistían en variar la cantidad de hidrolizado de plumas utilizado en el riego, utilizando como control un riego con agua destilada. En ese caso, el mayor peso seco obtenido fue cuando la planta era tratada con una relación de 3 kg/10 kg de suelo.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*



Figura 6. Estudio del crecimiento de las plantas de tomate platense a escala de invernadero. Fotografías A-C corresponden a 7 días de cultivo, de izquierda a derecha: bajo indol, alto indol y solución de Fähræus comparadas con el control con agua destilada. Fotografías D-F corresponden a 9 días de cultivo en el mismo orden que las anteriores. Fotografías G-H corresponden a 11 días de cultivo, en G se observa de izquierda a derecha control con agua destilada, solución de alto indol y luego bajo indol y en H se observa en sentido anti horario comenzando por abajo a la izquierda control con agua destilada, bajo indol, sol. de Fähræus y alto indol. Fotografías I-J corresponden a 13 días de cultivo, Fotografías K-M 15 días de cultivo y N-Q 18 días de cultivo. En las fotografías I, K,L, N y O se comparan de izquierda a derecha control con agua destilada, bajo indol y alto indol, en tanto que en las fotografías J, M y P en sentido anti horario comenzando por abajo a la izquierda se observa control con agua destilada, bajo indol, sol. de Fähræus y alto indol. En la fotografía Q se observa además una nueva fila con en tratamiento con solución de Fähræus (derecha). Fotografías R-U, 21 días de cultivo donde se observa la clorosis de las plantas control con agua destilada ( R ), plantas regadas con bajo indol (S), plantas regadas con sol. de Fähræus (T) y plantas sin clorosis regadas con sol. de alto indol (U)

***Ensayo de biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos***

Dado que el hidrolizado proteico producido por *P. lilacinum* al degradar residuo pelo presentó –además de actividad proteolítica- una serie de características que lo hacen promisorio como agente fertilizante, tales como presencia de la fitohormona AIA, presencia de sideróforos y de, amonio, se decidió estudiar también la capacidad de este hidrolizado de ejercer biocontrol sobre ciertos fitopatógenos, a saber: *Trichoderma* sp. # 38, *Fusarium graminearum* FUSKU # 117, *F. graminearum* # 206, *F. culmorum* # 29 y *Alternaria alternata* # 25031, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Diaporthe* spp. y *Pythium ultimum*. El hidrolizado enzimático se plaqueó como aditivo de agar papa glucosado y el crecimiento de las diferentes colonias de fitopatógenos se observó diariamente a fin de determinar el porcentaje de inhibición del extracto (% Inh.) respecto de las mismas cepas crecidas sobre agar papa glucosado sólo. En la Tabla 11 se presenta el efecto antagonista ejercido por el hidrolizado enzimático en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de *Trichoderma* sp. # 38, *Fusarium graminearum* FUSKU # 117, *F. graminearum* # 206, *F. culmorum* # 29 y *Alternaria alternata* # 25031. El crecimiento radial y el porcentaje de inhibición se calcularon a todos los tiempos, sin embargo, a los efectos de poder comparar los resultados obtenidos aquí con otros ensayos de biocontrol reportados en bibliografía se informan sólo los obtenidos a las 70 h de incubación. Se observa que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto al desarrollo de cada una de las colonias de las cepas estudiadas en el medio control y en el medio en presencia del extracto enzimático, a excepción de *F. graminearum* FUSKU # 117, donde no se observó diferencia alguna en el crecimiento de la colonia. Se observó que en los cultivos control, *Trichoderma* sp. cubre el 100 % de la caja de Petri a las 89 h de incubación, en tanto que *A. alternata* lo hace a las 166 h de incubación al igual que lo hacen *F. culmorum* y *F. graminearum* # 206. En presencia del hidrolizado enzimático se observó que ya a las 22 h de incubación éste ejercía inhibición en el crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. # 38 (58.8 % de inhibición), *F. culmorum* # 29 (32.8 % de inhibición) y *Alternaria alternata* # 25031 (36.3 % de inhibición) pero no en el crecimiento de *F. graminearum* # 206 en el cual dicha inhibición se comenzó a observar luego de 46 h de incubación (Figura 12).



*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

Tabla 11. Efecto antagonista del extracto enzimático producido de la degradación de residuo pelo por parte de *P. lilacinum* en el crecimiento radial, tasa de crecimiento (TC) y porcentaje de inhibición micelial de varios fitopatógenos

Cepa	Crecimiento radial (cm)	T. C. (cm/día)	T. C. (cm/día- en presencia del hidrolizado enzimático)	% Inhibición
<i>Trichoderma</i> sp. # 38	3.45	2.5	1.1	63.0
<i>F. culmorum</i> #29	2.35	1.8	1.3	34.0
<i>F. graminearum</i> FUSKU # 117	1.7	0.8	0.8	-
<i>F. graminearum</i> # 206	1.75	1.3	1.1	27.0
<i>A. alternata</i> # 25031	1.75	1.2	0.5	57.0

Salvo para la cepa *F. graminearum* FUSKU # 117, todas las demás cepas patógenas lograron ser controladas por el extracto enzimático en un porcentaje mayor al 25 %, con una mayor reducción en la tasa de crecimiento de 2.5 a 1.1 cm/día para el caso de *Trichoderma* sp. y de 1.2 a 0.5 cm/día para *A. alternata*, respectivamente.

Stefanova et al. (1999) estudiaron la actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. demostrando que éstas producen enzimas líticas como proteasas, quitinasas y celulasas, y al realizar el estudio de la capacidad de biocontrol de dicho hidrolizado utilizando la misma metodología utilizada aquí, encontraron que los filtrados limitaron el crecimiento de las especies fitopatógenas *Phytophthora nicotianae* y *R. solani* mediante la producción de metabolitos no volátiles y enzimas líticas.

En cuanto a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Diaporthe* spp. y *Pythium ultimum* se observó que en todos los casos el hidrolizado enzimático produjo un efecto fungistático del hongo patógeno, con un porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial del 52 % para *R. solani*, del 69.4 % para *T. harzianum*, del 68 % para *Diaporthe* sp. y del 55 % para el caso de *P. ultimum* a las 44 h de incubación (Figura 13).

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

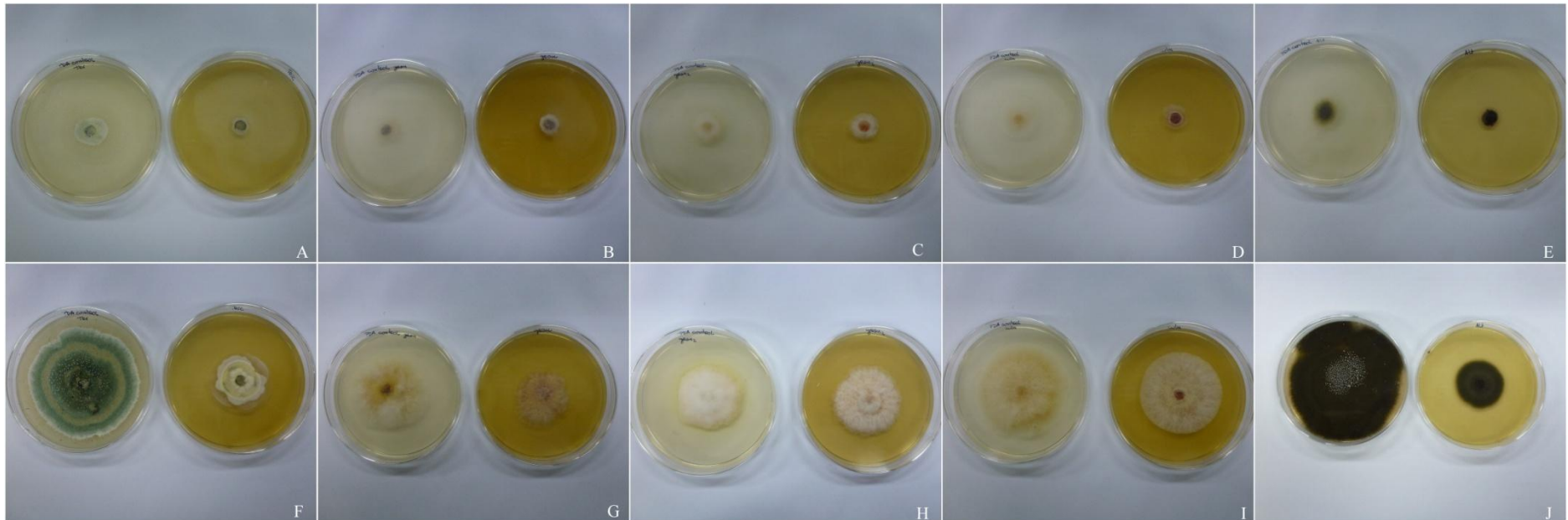


Figura 12. Control de fitopatógenos por parte del extracto enzimático de *P. lilacinum*. De A a E y de F a J, los fitopatógenos estudiados fueron: *Trichoderma* sp. # 38, *F. graminearum* # 206, *Fusarium graminearum* FUSKU # 117, *F. culmorum* # 29 y *Alternaria alternata* # 25031. A la izquierda de cada fotografía se observa el control de cada patógeno crecido en agar papa glucosado y a la derecha en fitopatógeno crecido en agar papa glucosado en presencia del extracto enzimático (una placa de cinco replicas). La fila de más arriba corresponde a las 46 h de incubación en tanto que la de abajo corresponde a las 94 h, salvo para *A. alternata* que la fotografía J fue tomada a las 166 h de incubación

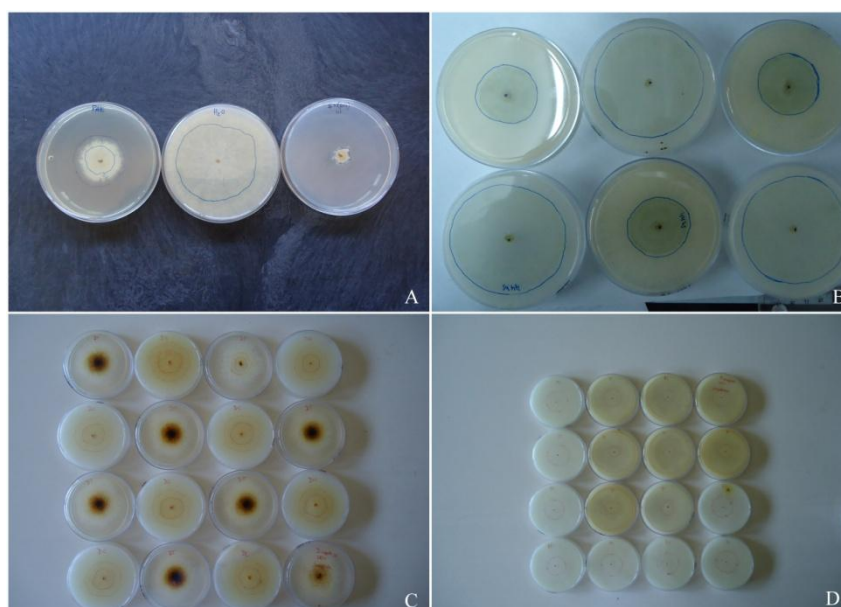


Figura 13. Control de fitopatógenos por parte del extracto enzimático de *P. lilacinum*. De A a D los fitopatógenos estudiados fueron: *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Diaporthe* spp. y *Pythium ultimum*. A) Se observa en el centro de la figura el control del ensayo con *R. solani* creciendo sobre agar para glucosado, a la izquierda en presencia del extracto enzimático de *P. lilacinum* y a la derecha en presencia del sobrenadante de *Bacillus* sp. # B4. B) Control sobre *T. harzianum*, con color azul se marcó el crecimiento de la cepa a las 44 h de incubación. C) Control sobre *Diaporthe* spp. se observó que además en presencia del extracto enzimático de *P. lilacinum*, el hongo patógeno cambió a un tono más oscuro el color del centro de la colonia. D) Control sobre *P. ultimum*, con rojo se marcó el crecimiento a las 44 h de incubación

El efecto fungistático ejercido por el hidrolizado enzimático de *P. lilacinum* sobre una gran variedad de fitopatógenos puede ser atribuido a la presencia de compuestos no volátiles como sideróforos y de enzimas líticas (serin proteasas) entre otros, así como también a la presencia de compuestos volátiles como el amoníaco que se desprende del hidrolizado como producto de la degradación del residuo pelo. Cuando se realizó el enfrentamiento de la cepa *P. lilacinum* con *R. solani* en ensayos duales, se observó que la inhibición en el crecimiento de este fitopatógeno se dio aún cuando los hongos no estaban en contacto mutuo, sugiriendo la producción de metabolitos difusibles por parte de *P. lilacinum* (Figura 14). En la Figura 14 C no sólo se observa que *P. lilacinum* inhibió la expansión miceliar de *R. solani* por la producción de metabolitos difusibles, sino que produciendo un cambio en el aspecto de la colonia en la zona de aproximación, lo que demuestra la degradación o necrosis del mismo.

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*



Figura 14. Ensayos duales en medio agar papa glucosado entre *P. lilacinum* y *R. solani*. A) Control donde solo crece el fitopatógeno, B) Inhibición del crecimiento por parte de *P. lilacinum*, C) Se observa un cambio de color y textura del micelio de *R. solani* en las cercanías de *P. lilacinum*

## **Conclusiones**

En la actualidad existe una tendencia progresiva hacia la reducción del uso tanto de fertilizantes inorgánicos como de pesticidas sintéticos invitando a los investigadores a la búsqueda de alternativas para mejorar la agricultura y hacerla más sostenible. En este sentido, la búsqueda de nuevos microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal es un campo siempre en vigencia y crecimiento. A lo largo de este capítulo se estudió la capacidad de *P. lilacinum* LPSC # 876 de ejercer la promoción del crecimiento vegetal a través de su hidrolizado enzimático producto de la degradación del residuo pelo. Se encontró que esta cepa tiene la capacidad de producir la hormona de crecimiento ácido indolacético, además de sideróforos y amonio durante su crecimiento en medios líquidos en presencia de triptófano y bajo contenido de hierro. Se logró optimizar los componentes del medio con el fin de maximizar la expresión de los dos primeros promotores citados, para ser luego evaluado el extracto en cuanto al poder de germinación de semillas de tomate, el crecimiento de plantas de tomate así, como también en el control de fitopatógenos. De esta evaluación podemos resaltar que 3 dosis de este hidrolizado tuvieron efectos sostenidos en el tiempo, incluso más que la solución de referencia cuando se lo probó como fertilizante en condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos demuestran que la capacidad de producir los metabolitos citados confieren a *P. lilacinum* LPSC # 876 y más específicamente hablando, al hidrolizado producto de la degradación del residuo queratínico, un potencial y amplio uso en la agricultura orgánica, tanto en la promoción del crecimiento vegetal como fertilizante orgánico, como así también en el control biológico de enfermedades de plantas.

**Bibliografía**

- Adetunji, C.O., Makanjuola, O.R., Arowora, K.A., Afolayan, S.S., and Adetunji, J.B. (2012) Production and application of keratin-based organic fertilizer from microbially hydrolyzed feathers to cowpea (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Scientific & Engineering Research* 3:1- 9
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M.S. (2005) Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29:29- 34
- Alexander , D.B. & Zuberer, D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12:39- 45
- Balaji, N., Lavanya, S., Muthamizhselvi, S., and Tamilarasan, K. (2012) Optimization of fermentation condition for indole acetic acid production by *Pseudomonas* species. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 3:797- 803
- Baligh, M., Conway, K.E., and Delgado, M.A. (1991) Development of a bioassay system to compare quantities of ammonia produced by strain of *Pseudomonas* spp., potential biocontrol agents againts soilborne fungi. 81 :1228- 1228
- Bashan Y and Bashan LE (2005) Plant Growth Promoting. In: *Encyclopedia of soils in the environment*, Hillel D (ed) Elsevier, Oxford, UK, pp 103-115
- Batista, B. & Felipe, E. (1990) Densidad de siembra y nivel de fertilización en almácigos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Facultad de Agronomía* 16:115- 132
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248- 254
- Cabeza, L.F., Taylor, M.M., DiMaio, G.L., Brown, E.M., Marmer, W.N., Carrió, R., Celma, P.J., and Cot, J. (1998) Proccesing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium. *Waste Managment* 18:211- 218
- Chaney, A. & Marbach, E. (1961) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8:130- 132
- Chincholkar SB, Chaudhari BL, Talegaonkar SK, and Kothari RM (2000) Microbial iron chelators: a sustainable tool for the biocontrol of plant disease. In: *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture*, Upadhyay RK (ed) Springer US, New York, pp 49-70
- Chun-Chao, C., Yu-Lin, K., Chen-Ching, C., and Wei-Liang, C. (2007) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43:575- 584
- Datta, C. & Base, P. (2000) Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological Research* 155:123- 127

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

- Fuchs, J. G., Berner, A., Mayer, J., Schleiss, K., and Kupper, T. (2008) Effects of compost and digestate on the environment, soil fertility and plant production - Results of two research project. 1- 5
- Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109- 117
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61:793- 796
- Gosh, A.C. & Basu, P. (2002) Growth behaviour and bioproduction of indole acetic acid by a *Rhizobium* sp. from root nodules of leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. *Indian Journal Experimental Biology* 40:796- 801
- Gousterova, A., Nustorova, M., Paskaleva, D., Naydenov, M., Neshev, G., and Vasileva-Tonkova, E. (2012) Assessment of feather hydrolysate from thermophilic actinomycetes for soil amendment and biological control application. *International Journal of Environmental Research* 6:467- 474
- Gram, L. (1996) The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 25:199- 205
- Gupta, A., Gopal, M., and Tilak, K.V. (2000) Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology* 38:856- 862
- Hernández-Mendoza, J.L., Quiroz-Velásquez, J.D., Moreno-Medina, V.R., and Mayek-Pérez, N. (2008) Biosynthesis of anthranilic and indolacetic acids from tryptophan by one *Azospirillum brasilense* strain native from Tamaulipas, México. *Avances en Investigación Agropecuaria* 12:57- 67
- Howell, C.R., Beier, R.C., and Stipanovic, R.D. (1988) Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Ecology and Epidemiology* 78:1075- 1078
- Jeong, J., Lee O., Jeon, Y., Kim, J., and Lee, N. (2010) Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that prodecus plant growth-promoting activity. *Process Biochemistry* 45:1738- 1745
- Khan, A., Geetha, A., Pandya, A., Archana, G., and Desai, A.J. (2006) Differential cross-utilization of heterologous siderophores by nodule bacteria of *Cajanus cajan* and its possible role in growth under iron-limited conditions. *Applied Soil Ecology* 34:19- 26
- Kim, J.M., Yang, M.C., and Hyung, J.S. (2004) Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:472- 476
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. (1980) *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology* 4:317- 320
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., and Zablotowicz, R.M. (1989) Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39- 44

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

- Kögl, F. & Kostermans, D. (1934) Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. XIII. Isolierung aus Hefe. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie 228:113-121
- Lim, H.S., Kim, Y.S., and Kim, S.D. (1991) *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. Applied and Environmental Microbiology 57:510- 516
- Mackie, C. & Birkbeck, T.H. (1992) Siderophores produced by *Vibrio anguillarum* in vitro and in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 15:37- 45
- Mohamed, A., Sokkary, J.H., and Tucker, T.C. (1987) Growth and chlorophyll mineral and total aminoacid composition of tomato and wheat plants in relation to nitrogen and iron nutrition. Growth and nutrient uptake. Journal of Plant Nutrition 10:699- 712
- Nustorova, M., Braikova, D., Gousterova, A., Vasileva-Tonkova, E., and Nedkov, P. (2006) Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep`s wool waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22:383- 390
- Pandey, A., Das, A.N., Kumar, B., Rinu, K., and Trivedi, P. (2008) Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:97- 102
- Patil, N.B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S., Gunjal, A., and Balasahed, P. (2011) Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. International Journal of Environmental Sciences 2:295- 302
- Patten, C. & Glick, B. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology 68:3795- 3801
- Pavlica, D.A., Hora, T.I., Bradshaw, J.J., Skogerboe, R.K., and Baker, R. (1978) Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. Phytopathology 14:758- 765
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C. (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil 321:305- 339
- Ros, M., Hernandez, M.T., and García, C. (2003) Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. Soil Biology and Biochemistry 35:463- 469
- Sanjuan J (2007) Introduccion. In: *Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial.*, Izaguirre-Mayoral ML (ed) Primera Edición. Editorial Universitaria, La Habana, pp 1-3
- Sasirekha, B., Shivakumar, S., and Sullia, S.B. (2012) Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid (iaa) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 12:863- 873
- Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., and Ramasubramanian, V. (2012) Plant growth promoting activity of nickel tolerant *Bacillus cereus* TS1. Journal of Agricultural Technology 8:2101- 2113



*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

- Sridevi, M. & Mallaiah, K.V. (2007) Bioproduction of indole acetic acid by Rhizobium strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. Iranian Journal of Biotechnology 5:178- 182
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., and Coronado, M.F. (1999) Metabolic activity of *Trichoderma* spp. isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi. Revista Facultad de Agronomía 16:509- 516
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S., Cherdyntseva, T.A., and Netrusov, A.I. (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. Applied Biochemistry and Microbiology 42:117- 126

*Aplicación como promotor del crecimiento vegetal*

## *Conclusiones Generales*



## *Conclusiones generales*

La problemática ambiental que generan los residuos agroindustriales junto con el costo nulo que significa su adquisición y la posibilidad de utilizarlos como materia prima para producir productos de valor agregado como lo son los catalizadores biológicos fue lo que motivó el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral. Se comenzó estudiando una serie de microorganismos – previamente reportados como queratinolíticos - con el objetivo de seleccionar aquel que expresara en un medio mineral mínimo en presencia de residuo pelo como única fuente de carbono y nitrógeno, la mayor actividad queratinolítica. Se continuó con la optimización de los componentes presentes en el medio de cultivo a fin de optimizar la producción de las enzimas queratinolíticas por parte del microorganismo seleccionado (*Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876) y la posterior purificación y caracterización de la queratinasa presente en el hidrolizado. Se estudió de manera más profunda el perfil de inactivación térmica que presentaba la enzima y la posibilidad de estabilizarla a altas temperaturas por medio del agregado de metales y polioles. Continuando con la tendencia de minimizar los efectos nocivos hacia el ser humano y el medio ambiente por parte de residuos y ciertos químicos, se decidió estudiar la posibilidad de inmovilizar la enzima sobre esferas de quitosán estudiando la posibilidad de utilizar un agente entrecruzante menos tóxico que el glutaraldehído y caracterizar el sistema obtenido. Y por último, se evaluó la potencial aplicación del extracto enzimático en diferentes campos industriales.

Luego de seleccionar a *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 como microorganismo de trabajo y mediante la optimización de los componentes del medio de cultivo, se logró aumentar en un factor de 10.8 veces la producción de enzimas queratinolíticas por parte del mismo.

Mediante una serie de pasos cromatográficos se purificó la enzima queratinolítica presente en el extracto enzimático, caracterizándola desde el punto de vista bioquímico como una serín-proteasa tiol-dependiente de 37 kDa. La característica más relevante de esta enzima es su estabilidad en ambientes extremadamente alcalinos (pHs superiores a 10) y en presencia de agentes oxidantes como el perborato de sodio abriendo la posibilidad de su uso en la industria de los detergentes donde hoy en día, la mayoría de las enzimas utilizadas presentan esta estabilidad gracias a ingeniería de proteínas.

### *Conclusiones generales*

Al momento de estudiar el perfil de inactivación térmica que presentaba esta enzima se corroboró que la misma no seguía un comportamiento cinético usual de primer orden, sino que dentro de los modelos estudiados, la distribución de Weibull resultó ser el modelo que mejor describió la actividad enzimática residual de la queratinasa luego de los diferentes tratamientos térmicos. Al investigar el efecto del agregado de reconocidos agentes estabilizadores se encontró que la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (5 mM) aumentaba la vida media de la enzima en un factor de 13 veces con respecto al control a 50 °C.

Otra manera con la que se logró estabilizar la enzima pura y con la ventaja adicional de que pudo ser reutilizada más de una vez, fue mediante la inmovilización de la misma sobre esferas de quitosán utilizando un agente entrecruzador natural llamado genipina. La enzima inmovilizada demostró tener mayor estabilidad frente a pH extremos y también, mayor estabilidad a la temperatura que la que presentaba la enzima libre en solución. Por otra parte, el sistema fue sometido a 5 ciclos de hidrólisis consecutivos, observándose una pérdida total del 38.8 % de actividad al finalizar la experiencia.

Dentro de las potenciales aplicaciones tecnológicas donde este extracto enzimático podría ser utilizado, se evaluó su potencial uso como aditivo de detergentes comerciales comprobándose que éste era capaz no sólo de soportar el ambiente generado por estos detergentes en cuanto a altos pHs, presencia de agentes secuestrantes y blanqueadores, sino que era capaz de remover machas de sangre sobre tela de algodón luego de ser sometido a la experiencia de lavado en presencia del detergente Skip. En cuanto a su compatibilidad y estabilidad frente a los distintos detergentes comerciales a distintas temperaturas se pudo concluir que para ciclos de lavados largos (60 min) el extracto enzimático sería más efectivo si se lo utiliza a temperaturas de entre 30 y 40°C y para ciclos de lavado cortos (10-30 min) podría ser utilizado incluso a altas temperaturas (50°C).

Se evaluó también, la posibilidad de recuperar plata a partir de residuos médicos como lo son las placas radiográficas a fin de plantear un método de obtención de este metal menos contaminante y más efectivo. Gracias a la acción del extracto enzimático sobre las placas radiográficas se logró la hidrólisis de las capas de gelatina y la

### *Conclusiones generales*

concomitante liberación de las partículas de plata, lográndose recuperar no sólo el metal sino también las placas de *PET*. El contenido total de plata recuperada (en forma de AgCl) fue determinado gravimétricamente y resultó ser de 0.62% del peso total de las placas radiográficas. Se observó que a 60 °C, el extracto enzimático hidrolizaba completamente las películas de gelatina en 6 minutos, y gracias a la capacidad del glicerol de estabilizar al mismo, una única dosis del extracto pudo ser utilizado en 7 ciclos de hidrólisis.

Por último, continuando con el estudio de las aplicaciones biotecnológicas, se evaluó la capacidad del hidrolizado enzimático de ser aplicado en el campo de la agricultura, más específicamente como agente promotor del crecimiento vegetal. Se demostró que *P.lilacinum* LPSC #876 fue capaz de producir una fitohormona relacionada con el crecimiento radicular de los vegetales y se logró optimizar su producción adicionando al medio un precursor de la misma, como lo es el triptófano. Se realizaron ensayos de germinación y de crecimiento en condiciones gnotobióticas a escala de invernadero del tomate platense italiano (*Lycopersicum esculentum*) encontrándose que el extracto ejerció un efecto positivo tanto en la velocidad de germinación como en el desarrollo radicular de las plantas al ser comparadas con las plantas control. Se observó además, que el extracto enzimático ejercía efecto fugistático sobre varias cepas fitopatógenas como *Rizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*, entre otras, gracias a la presencia en el mismo no sólo de enzimas líticas como lo son las proteasas, sino también de sideróforos y amoníaco, planteando la posibilidad de su uso en la agricultura orgánica, tanto en la promoción del crecimiento vegetal como fertilizante orgánico, como así también en el control biológico de enfermedades.

Gracias a la experiencia adquirida durante la realización de la presente Tesis Doctoral se abre la posibilidad de continuar con esta línea de trabajo, específicamente con el estudio de la utilización de microorganismos como alternativa a la disposición de residuos agroindustriales, así también como con la búsqueda, caracterización y aplicación de nuevos catalizadores de potencial aplicación industrial. Hasta el momento el grupo formado a partir de esta Tesis Doctoral es el único grupo de investigación en la

### *Conclusiones generales*

Argentina que estudia el uso de residuos de naturaleza queratínica como un sustrato fermentable del cual obtener productos de valor agregado.