

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PROTEASAS DE
BACTERIAS HALOTOLERANTES M3H1027, ML106512 Y M4H153D**

Presentado por:

Bach. MILAGROS LEÓN ESCOBAR

**Para optar al título profesional de
BIÓLOGO**

Asesora:

Dra. MARÍA ANTONIETA QUISPE
RICALDE

Co-Asesor:

Blg. JOSÉ LUIS SIERRA HERRERA

Tesis financiada por la UNSAAC

CUSCO-2023

La realización de la presente Tesis ha sido posible gracias a la concesión de la subvención del proyecto “Inhibición de proteasas de *Leishmania* a través de péptidos obtenidos de proteínas de *Lupinus mutabilis* por acción enzimática de proteasas de bacterias halófilas: Nuevas perspectivas de búsqueda de moléculas antileishmanicidas”, Contrato N° 023-2018-UNSAAC aprobado por Resolución N° R-267-2018-UNSAAC y Resolución N° R-0392-2018-UNSAAC.

DEDICATORIA

Al Sr. De Qoyllorrit'y, por guiar mi camino y darme la fuerza para seguir adelante.

A mi familia, que es lo más importante en mi vida, mis padres Miguel y Aida y a mi hermano Diego, por sus palabras de aliento, su apoyo, su confianza, su gran amor en cada momento de mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde mi más profundo agradecimiento por la orientación y seguimiento constante en este trabajo de tesis.

Al Blg. José Luis Sierra por su valioso apoyo y co asesoramiento en la elaboración de este trabajo de investigación.

A la Mgt. Ingrid Vera Ferchau, responsable del laboratorio 302 de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por permitirnos trabajar la parte experimental de este estudio.

A mis amigos Elizabeth, Coraima, Mayra y Brandon por darme su apoyo incondicional, esa confianza y esos momentos gratos durante mi vida profesional.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN..... | I |
| INTRODUCCIÓN..... | II |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | III |
| JUSTIFICACIÓN..... | IV |
| OBJETIVOS..... | V |
| HIPÓTESIS | VI |
| VARIABLES..... | VI |
| MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1. Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.1. Internacionales | 1 |
| 1.1.2. Nacionales | 5 |
| 1.1.3. Locales | 7 |
| 1.2. Marco conceptual..... | 8 |
| 1.2.1. Microorganismos extremófilos | 8 |
| 1.2.2. Bacterias halófilas..... | 8 |
| 1.2.3. Enzimas..... | 10 |
| 1.2.4. Enzimas proteolíticas | 11 |
| 1.2.5. Inhibidores de proteasas..... | 12 |
| 1.2.6. Diversidad de bacterias halófilas..... | 13 |
| 1.2.7. Aplicación de las enzimas en la industria..... | 14 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 2.1. Lugar de ejecución del estudio | 15 |
| 2.2. Materiales..... | 15 |
| 2.2.1. Material biológico | 15 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2. Materiales de laboratorio | 16 |
| 2.3. Metodología | 18 |
| 2.3.1. Preparación de medios. | 18 |
| 2.3.2. Reactivación de cepas de bacterias halófilas | 19 |
| 2.3.3. Evaluación cualitativa de la actividad proteolítica..... | 20 |
| 2.3.4. Producción en masa del cultivo de bacterias halófilas | 21 |
| 2.3.5. Recuperación de proteasas extracelulares | 21 |
| 2.3.6. Recuperación de proteasas intracelulares..... | 21 |
| 2.3.7. Evaluación semicuantitativa de proteasas extracelulares producidas por bacterias halófilas..... | 21 |
| 2.3.8. Evaluación semicuantitativa de proteasas intracelulares producidas por bacterias halófilas..... | 22 |
| 2.3.9. Cuantificación de proteínas extracelulares e intracelulares. | 22 |
| 2.3.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 23 |
| 2.3.11. Zimograma copolimerizado con gelatina | 23 |
| 2.3.12. Métodos de inhibición..... | 24 |
| 2.3.13. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica..... | 24 |
| 2.3.14. Efecto del pH en la actividad proteolítica | 25 |
| 2.3.15. Efecto de NaCl en la actividad proteolítica..... | 25 |
| 2.3.16. Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica..... | 25 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 3.1. Reactivación de cepas de bacterias halófilas | 26 |
| 3.2. Evaluación cualitativa de la actividad proteolítica | 27 |
| 3.2.1. Prueba proteolítica utilizando como sustrato gelatina | 27 |
| 3.2.2. Prueba proteolítica utilizando como sustrato caseína. | 27 |
| 3.3. Evaluación semicuantitativa de la actividad proteolítica extracelular | 28 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1. Prueba proteolítica en gelatina..... | 29 |
| 3.3.2. Prueba proteolítica en caseína..... | 30 |
| 3.4. Evaluación semicuantitativa de la actividad proteolítica intracelular | 31 |
| 3.4.1. Prueba proteolítica en gelatina..... | 31 |
| 3.4.2. Prueba proteolítica en caseína..... | 32 |
| 3.5. Cuantificación de proteínas..... | 33 |
| 3.6. Actividad proteasa de los extractos extracelulares e intracelulares en función a la cantidad de proteína | 35 |
| 3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 38 |
| 3.8. Zimograma copolimerizado con gelatina..... | 41 |
| 3.9. Método de inhibición en zimograma | 44 |
| 3.10. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica..... | 47 |
| 3.11. Efecto del pH en la actividad proteolítica..... | 56 |
| 3.12. Efecto de NaCl en la actividad proteolítica | 63 |
| 3.13. Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica. | 69 |
| CONCLUSIONES..... | 76 |
| RECOMENDACIONES | 78 |
| BIBLIOGRAFÍA | 79 |
| ANEXO N°1..... | 87 |
| ANEXO N°2..... | 88 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Clasificación de las bacterias halófilas en base a la tolerancia de sal. | 9 |
| Tabla 2: Cepas de bacterias halófilas utilizadas en el estudio | 15 |
| Tabla 3: Composición del medio “sea water” (SW)..... | 18 |
| Tabla 4: Composición del medio de cultivo con gelatina | 19 |
| Tabla 5: Composición del medio de cultivo con caseína para 100ml | 19 |
| Tabla 6: Inhibidores de proteasas | 24 |
| Tabla 7: Crecimiento de cepas de bacterias halófilas recuperadas para este estudio. | 26 |
| Tabla 8: Actividad cualitativa de proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D en sustrato gelatina | 27 |
| Tabla 9: Actividad cualitativa de proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en sustrato caseína | 28 |
| Tabla 10: Diámetro de halo de hidrólisis de proteasas extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D en medio con sustrato gelatina..... | 29 |
| Tabla 11: Diámetro de halo de hidrólisis de proteasas extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D en medio con sustrato caseína. | 30 |
| Tabla 12: Actividad semicuantitativa de proteasas intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en medio con sustrato gelatina | 31 |
| Tabla 13: Actividad semicuantitativa de proteasas intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en medio con sustrato caseína | 32 |
| Tabla 14: Curva de calibración utilizando una solución de BSA a 100 µg/ml | 34 |
| Tabla 15: Concentración de proteínas de los extractos obtenidos de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D..... | 35 |
| Tabla 16: Actividad proteasa de extractos extracelulares e intracelulares (mm/µg de proteína) en sustrato gelatina. | 36 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 17: Actividad proteasa de extractos extracelulares e intracelulares (mm/ μ g de proteína) en sustrato caseína. | 37 |
| Tabla 18: Determinación de la movilidad electroforética relativa de las bandas del marcador de peso molecular conocido. | 39 |
| Tabla 19: Movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas de los extractos extracelulares e intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 40 |
| Tabla 20: Determinación de la movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas de proteínas del marcador de peso molecular conocido..... | 42 |
| Tabla 21: Determinación del peso molecular de las proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 43 |
| Tabla 22: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 52 |
| Tabla 23: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa ML106512 | 53 |
| Tabla 24: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 55 |
| Tabla 25: Efecto de pH en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 59 |
| Tabla 26: Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa ML106512 | 60 |
| Tabla 27: Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 61 |
| Tabla 28: Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 66 |
| Tabla 29: Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa ML106512 | 67 |
| Tabla 30: Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 68 |
| Tabla 31: Efecto de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027 | 72 |
| Tabla 32: Efecto del NaCl en la actividad proteolítica de la cepa ML106512..... | 73 |
| Tabla 33: Efecto del NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Curva estándar de BSA para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford..... | 33 |
| Figura 2: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los extractos extracelulares e intracelulares de las proteínas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 38 |
| Figura 3: Curva de calibración para hallar el peso molecular de proteínas incógnitas | 39 |
| Figura 4: Peso molecular versus movilidad electroforética relativa para la determinación del PM de las bandas de proteínas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D | 40 |
| Figura 5: Zimograma en presencia de gelatina al 0.1% de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 41 |
| Figura 6: Peso molecular versus movilidad electroforética relativa para la determinación del PM de proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 42 |
| Figura 7: Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa M3H1027..... | 45 |
| Figura 8: Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa ML106512..... | 46 |
| Figura 9: Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa M4H153D..... | 47 |
| Figura 10: Evaluación de la actividad proteolítica a 4°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 48 |
| Figura 11: Evaluación de la actividad proteolítica a 20°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 48 |
| Figura 12: Evaluación de la actividad proteolítica a 30°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 49 |
| Figura 13: Evaluación de la actividad proteolítica a 40°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 49 |
| Figura 14: Evaluación de la actividad proteolítica a 50°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 50 |
| Figura 15: Evaluación de la actividad proteolítica a 60°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 50 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16: Evaluación de la actividad proteolítica a 70°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. | 51 |
| Figura 17: Evaluación de la actividad proteolítica a 80°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D..... | 51 |
| Figura 18: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027 | 53 |
| Figura 19: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa ML106512..... | 54 |
| Figura 20: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa ML106512 | 54 |
| Figura 21: Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 55 |
| Figura 22: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Tampón Acetato de Na (pH 5.24)..... | 57 |
| Figura 23: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Tampón fosfato de Na (pH 6.57) | 57 |
| Figura 24: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Tampón Tris-HCl (pH 9.25)..... | 58 |
| Figura 25: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Tampón Glicina NaOH (pH 10.04)..... | 58 |
| Figura 26: Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 59 |
| Figura 27: Efecto del pH en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa ML106512..... | 60 |
| Figura 28: Efecto del pH en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa ML106512..... | 61 |
| Figura 29: Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 62 |
| Figura 30: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a CaCl ₂ | 63 |
| Figura 31: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a MgCl ₂ | 64 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 32: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a $MnSO_4$ | 64 |
| Figura 33: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a $HgCl_2$ | 65 |
| Figura 34: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a $CuSO_4$ | 65 |
| Figura 35: Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 66 |
| Figura 36: Efecto de los iones metálicos en la actividad del extracto extracelular de la cepa ML106512..... | 67 |
| Figura 37: Efecto de los iones metálicos en la actividad del extracto intracelular de la cepa ML106512..... | 68 |
| Figura 38: Efecto de los iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 69 |
| Figura 39: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D con 0% NaCl..... | 70 |
| Figura 40: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en presencia de 10% NaCl..... | 71 |
| Figura 41: Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en presencia de 20% NaCl..... | 71 |
| Figura 42: Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027..... | 72 |
| Figura 43: Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa ML106573..... | 73 |
| Figura 44: Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa ML106512 | 74 |
| Figura 45: Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D..... | 75 |

RESUMEN

Las bacterias halófilas son microorganismos que crecen en ambientes con alto contenido de salinidad, capaces de producir proteasas importantes que han permitido el avance en la industria alimentaria, industria química y en biomedicina. El objetivo del trabajo fue caracterizar las proteasas intracelulares y extracelulares de bacterias halófilas obtenidas de los manantiales salinos de los distritos de Acos y Huanquite de la región Cusco. Para conseguir el objetivo, a partir de cepas previamente aisladas, se realizó una selección de aquellas con actividad proteolítica, y se evaluó la actividad semicuantitativa en extractos crudos extracelulares e intracelulares en función a la concentración de proteínas totales correspondientes. El procedimiento de caracterización consistió en evaluar la actividad proteolítica bajo los efectos de temperatura, pH, iones metálicos y NaCl.

La cepa **M3H1027** presenta 5 proteasas cuyos tamaños moleculares son de 25 kDa, 29.4 kDa, 39.4 kDa, 54.2 kDa y 57.4 kDa, presentan metalo, serín y cisteín proteasas inhibidas por EDTA, leupeptín y E-64 respectivamente. Posee actividad termal óptima en amplios rangos de temperatura (4-70°C), pH (5.25-10.04), concentración de NaCl (0-20%) y mostró alta actividad proteolítica en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . La cepa **ML106512** presenta 3 proteasas extracelulares cuyos tamaños moleculares son de 17.3 kDa, 25 kDa y 30.5 kDa y una proteasa intracelular de 17.3 kDa. Las proteasas de 25 y 30.5 kDa no presentan inhibición, y la proteasa de 17.3 kDa es una cisteín proteasa. Las condiciones de actividad óptima para estas proteasas fueron de 4-70°C, pH 6.57-10.04, NaCl 0-20 % y alta actividad proteolítica frente a Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . La cepa **M4H153D** presenta 5 proteasas cuyos tamaños moleculares son de 24.1 kDa, 27.7 kDa, 34.3 kDa, 39.4 kDa y 55.2 kDa, presentan metalo, serín y cisteín proteasas inhibidas por EDTA, leupeptín y E-64 respectivamente. Muestran actividad termal desde 30-70°C, pH 9.25-10.04, concentración de NaCl 0-20% y ligera actividad proteolítica frente a Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} pero fue inhibida por Hg^{2+} y Cu^{2+} .

INTRODUCCIÓN

Las bacterias halófilas son microorganismos adaptados a vivir en diversos ambientes salinos, es decir para su crecimiento óptimo requieren medios con altas concentraciones de sal. Estos organismos procariotes han desarrollado un sistema de adaptación complejo, que responde a los aumentos en la presión osmótica acumulando solutos compatibles en el citoplasma y ayudándolas a mantener un ambiente isotónico con ambiente en crecimiento. Estas sustancias también ayudan a proteger las células contra variaciones de temperaturas altas, la desecación y la congelación (Gomes & Steiner, 2004). Se conoce que las bacterias halófilas producen una amplia variedad de enzimas proteolíticas con poder catalítico y características estructurales manteniendo así los procesos fisiológicos y metabólicos en condiciones que incluyen altas concentraciones de sal (Kumar *et al.*, 2012).

Las proteasas comprenden un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas, hasta descomponerlas en polipéptidos o aminoácidos libres utilizando una molécula de agua. Estas enzimas son importantes porque muestran actividad óptima a valores extremos de temperatura, pH, presión y diferentes concentraciones de sales. Desde el punto de vista biotecnológico, se usan ampliamente en muchos sectores industriales como procesamiento de detergentes y alimentos, procesos biosintéticos, biorremediación ambiental e industria farmacéutica (Daoud *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2009).

La detección de enzimas hidrolíticas producidas por bacterias halófilas constituye un tema interesante de investigación debido al gran potencial biotecnológico exhibido por éstas. El objetivo de este estudio es investigar la presencia de bacterias halófilas que sean capaces de producir proteasas extracelulares e intracelulares.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enzimas proteolíticas son utilizadas para mejorar la eficacia y rentabilidad en la industria química debido a su alto potencial, siendo las más comercializadas en el mercado a nivel mundial (Alnahdi, 2012; Maruthiah & Palavesam, 2016; Daoud *et al.*, 2016; Mostafa *et al.*, 2012). En nuestro país, el estudio con respecto al microbiota presente en ambientes halófilos es muy reducido, y de igual forma el estudio de las enzimas de estos microorganismos.

En años recientes, la investigación científica acerca del aislamiento e identificación de microorganismos halófilos y la producción de enzimas extracelulares y metabolitos ha generado gran interés y relevancia debido a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas. Las enzimas con actividad proteolítica han cobrado mayor importancia ya que su aplicación dentro de los campos de la industria ha ido incrementando.

En base a esta información, para la realización del presente estudio, se formula la siguiente pregunta: ¿Cuáles serán las características bioquímicas de las proteasas de bacterias halotolerantes M3H1027, ML106512 y M4H153D?

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias halófilas viven en ambientes salinos, que son entornos adecuados para su crecimiento y producción de enzimas activas y estables en concentraciones de sal diferente. En la actualidad la industria de las enzimas ha generado una buena demanda a consecuencia de un rápido desarrollo gracias a la evolución de la biotecnología moderna. Se han utilizado enzimas hidrolíticas como una alternativa de productos químicos para mejorar la eficacia y rentabilidad de una gran variedad de aplicaciones y procesos industriales. Las proteasas constituyen uno de los grupos más importantes en la industria de las enzimas, estas han sido empleadas para la producción de alimentos, fabricación de productos como el cuero, industria de detergente, textiles y almidón (Kirk *et al.*, 2002), industria farmacéutica, procesos biosintéticos, biorremediación ambiental (Moreno *et al.*, 2009), producción de ectoína y bacteriorodopsina (Oren, 2010), entre otras aplicaciones.

Se han registrado pocos estudios en nuestro entorno que se basa en la búsqueda de microorganismos halófilos con capacidad de producir enzimas proteolíticas, en el 2016 Gárate estudió la caracterización de proteasas de excreción producidas por las cepas N9 y N10 de bacterias halotolerantes aisladas de las salineras de Maras y en el 2018 Huaihua purifica, caracteriza e inmoviliza enzimas proteolíticas de excreción producidas por *Staphylococcus sp.* provenientes de las salineras de Maras. Recientemente la producción de enzimas proteolíticas ha generado gran interés por lo que se potencia el valor que puedan tener los microorganismos halófilos para secretar estas enzimas y explotar esta riqueza biológica. El presente estudio de investigación se enfoca en la caracterización de las proteasas extracelulares e intracelulares aisladas a partir de bacterias halófilas M3H1027, ML106512 y M4H153D y de esta forma describir a la biodiversidad microbiana como una fuente de valor biotecnológico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar proteasas extracelulares e intracelulares de bacterias halotolerantes denominadas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad proteolítica cualitativa de bacterias halotolerantes M3H1027, ML106512 y M4H153D.
2. Evaluar la actividad proteolítica semicuantitativa de bacterias halotolerantes M3H1027, ML106512 y M4H153D.
3. Caracterizar bioquímicamente las proteasas extracelulares encontradas.
4. Caracterizar bioquímicamente las proteasas intracelulares encontradas.

HIPÓTESIS

Las cepas de bacterias halófilas M3H1027, ML106512 y M4H153D, expresan proteasas y estas pueden ser caracterizadas.

VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES.

- Medio de cultivo
- Sustratos
- Inhibidores
- pH
- Temperatura
- Iones metálicos

VARIABLES DEPENDIENTES.

- Proteasas producidas por bacterias halófilas.
- Actividad proteolítica de proteasas extracelulares de bacterias halófilas.
- Actividad proteolítica de proteasas intracelulares de bacterias halófilas.

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. INTERNACIONALES

Daoud *et al.*, 2016. Aislaron 110 bacterias halófilas y halotolerantes para la producción de proteasas. Una cepa moderadamente halófila (CJ4), aislada en Túnez, mostró la mayor actividad en la placa de agar. La caracterización bioquímica y fisiológica de la cepa aislada junto con el análisis de secuencia de 16S rRNA lo colocó en el género *Halobacillus*. La producción de proteasa fue máxima a 120 g /L de NaCl y su actividad fue óptima a NaCl 0,4 M, pH 9.0 y 45°C siendo inhibida por PMSF, revelando el predominio de las serinas proteasas y exhibiendo alta estabilidad en presencia de varios solventes orgánicos y detergentes. Estos hallazgos hacen que la proteasa de *Halobacillus sp.* CJ4 sea de gran interés para muchas aplicaciones biotecnológicas con alto contenido de sal o agua, como la síntesis de péptidos y la formulación de detergentes.

Dammak *et al.*, 2016. Aislaron 54 cepas halófilas de estanques cristalizadores TS18 y no cristalizadores M1 encontradas en las salinas solares de Sfax, Túnez y analizaron su capacidad para producir actividades de proteasa, amilasa y lipasa. La cepa ETR14 del estanque TS18 mostró rendimientos máximos de producción de proteasa y se reveló que pertenecía a la especie *Halorubrum ezzemoulense*. Otros resultados indicaron que se obtuvieron rendimientos óptimos de crecimiento y producción de proteasa con concentraciones de NaCl al 10% en el medio DSC-97. La enzima pudo mantener altos niveles de actividad de proteasa a concentraciones de sal de hasta el 25%, una actividad óptima a pH 9.0 y 60°C, lo que la distingue de otras proteasas descritas previamente de otros miembros de los géneros de *Holoarchaea* y lo convierten en un candidato prometedor para su aplicación en diversas industrias.

Elbanna *et al.*, 2015. Aislaron 33 cepas halófilas productoras de proteasas de muestras de sal recolectadas del lago Qarun en Egipto. Se caracterizó e identificó una cepa como

Halobacterium sp. cepa HP25 basada en secuenciación del gen 16S rRNA y caracterización fenotípica. Se purificó una proteasa termofílica haloalcalina, de una masa molecular de 21 kDa, actividad específica de 6350 U/mg y además se observó que es inhibida por EDTA y PMSF.

Desai & Vyas, 2014. Aislaron bacterias halotolerantes productoras de proteasas alcalinas del agua marina del Golfo de Cambay, Guyarat, India. Identificaron una cepa de *Bacillus sp.* cepa TD productora de una proteasa alcalina de 66 kDa y lograron optimizar la producción de tales enzimas a 45° C, pH 11 y 0.5% de NaCl.

Awad *et al.*, 2013. Purificaron la proteasa alcalina de la cepa *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15 aislada de suelos en Egipto usando precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna Sephadex G-100. La enzima se purificó a 77,24 veces con un rendimiento del 91.8% y la actividad específica fue de 112U/mg de proteína. La proteasa mostró una única banda en SDS-PAGE con peso molecular de 20 kDa, y la actividad relativa máxima fue del 100% utilizando caseína como sustrato y mostró parámetros óptimos de pH y temperatura a 9.5 y 50°C respectivamente. La actividad enzimática fue completamente inhibida por el inhibidor de serina en el sitio activo y fue incrementada por los iones metálicos Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ y Mg^{2+} .

Alnahdi, 2012. Aisló a *Bacillus sp.* de muestras marinas locales recolectadas de Arabia Saudita para evaluar la producción de enzimas proteolíticas. Se seleccionaron dos cepas productoras de proteasa, N° 2 y N° 3, sobre la base de hidrolizados de gelatina, siendo esta el mejor sustrato frente a la leche descremada para una prueba proteolítica cualitativa. La enzima proteasa extracelular de la cepa N° 2 alcanzó la máxima actividad proteasa siendo 243 U/ml.

Xin *et al.*, 2011. En China aisló una bacteria LY6 moderadamente halófila con alta actividad proteolítica. Se identificó al género *Halobacillus* mediante el análisis de secuencia de ADNr 16S. La salinidad del medio de cultivo influyó fuertemente en la producción de proteínasa de LY6 utilizando el 10% de NaCl. La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE y el análisis de zimografía de

gelatina revelaron que era un monómero con un alto peso molecular de 69 kDa. La actividad óptima de proteinasa se obtuvo a pH 10.0, 40° C y 10% de NaCl. Además, la actividad enzimática fue notablemente mejorada por Ca^{2+} y Cu^{2+} , pero fuertemente inhibida por EDTA, PAO y DEPC, lo que indica que probablemente era una metaloproteinasa con residuos de cisteína e histidina ubicados en su sitio activo.

Mala & Srividya, 2010. En India estudiaron la producción de una proteasa alcalina de una cepa de *Bacillus*, aislada de suelos contaminados de lavanderías, con el objetivo de determinar la biocompatibilidad con detergentes. Lograron purificar parcialmente la enzima con sulfato de amonio (50 – 70% de saturación), y los análisis de zimografías con sustrato copolimerizado con caseína, revelan dos isoenzimas de tamaños moleculares aproximadamente 66 kDa y 18 kDa.

Moreno *et al.*, 2009. Aislaron y caracterizaron 43 cepas de bacterias halófilas extremas capaces de producir enzimas hidrolíticas como amilasa, proteasa, lipasa y ADNasa en hábitats hipersalinos del sur de España. Las cepas aisladas crecieron de manera óptima en medios con un 15-20% (p/v) de sales totales y, en la mayoría de los casos, se detectó un crecimiento de hasta 30% (p/v) de sales totales. Los géneros con mayor actividad de hidrolasas son *Halorubrum*, *Haloarcula* y *Halobacterium*, y tres aislamientos se caracterizaron como bacterias extremadamente halófilas siendo *Salicola*, *Salinibacter* y *Pseudomonas*. Se aisló también la cepa extremadamente halófila IC10 identificada como *Salicola*, esta muestra actividades de lipasa y proteasa teniendo gran potencial de interés biotecnológico, sus condiciones óptimas de crecimiento fueron 15-20% (p/v) de NaCl, pH 8.0 y 37°C.

Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009. En Irán investigaron la producción de una proteasa en condiciones de alta salinidad por la bacteria moderadamente halófila *Halobacillus karajensis* cepa MA-2 en un medio basal que contiene peptona, extracto de carne, maltosa y NaCl. Realizaron un estudio de la determinación de la temperatura, pH, sal y nutrientes de la proteasa de excreción mostrando secreción máxima a 34°C, pH 8.0-8.5 y en presencia de gelatina. La enzima proteolítica reveló una estructura monomérica

de peso molecular relativo de 36 kDa. La actividad caseinolítica máxima de la enzima se observó a 50 ° C, pH 9.0 y NaCl 0.5 M, aunque a 3M la actividad aún se mantenía.

Chamroensaksri *et al.*, 2008. Caracterizaron enzimas proteolíticas a partir de bacterias halófilas aisladas de pescados fermentados en Tailandia. La bacteria NB2-1 fue identificada como *Virgibacillus marismotui*, la cual presentó actividad proteolítica en 15% (p/v) de NaCl, pH 9.0 y temperatura a 30°C. La actividad fue fuertemente inhibida por PMSF y el gel de sustrato teñido con actividad indicó la presencia de varias proteasas que presentaban pesos moleculares de 17, 19, 24 y 35 kDa.

Xiong *et al.*, 2007. Se seleccionaron seis bacterias proteolíticas que se aislaron de sedimentos de agua profunda del Golfo de Alaska en el Océano Pacífico. Se realizó el estudio para la producción de proteasas en un medio que contenía 2% de leche descremada en polvo y 1% de triptona. De las seis proteasas producidas, dos eran proteasas neutras adaptadas al frío que mostraban su actividad óptima a pH 7.0–8.0 y 35° C, y las otras cuatro eran proteasas alcalinas que mostraban su actividad óptima a pH 9.0 y 40-45 ° C. A través de la SDS-PAGE se reveló una proteasa de peso molecular de 34 kDa y fue inhibida por el EDTA. La secuenciación de aminoácidos de novo demostró que la proteasa E1 es una proteína nueva.

Namwong *et al*, 2006. Una bacteria halófila identificada como *Halobacillus sp.* cepa SR 5-3 fue aislada de muestras de salsa de pescado en Tailandia. Esta bacteria produce una proteinasa de 43 kDa con una actividad óptima a 50°C y pH 9.0-10.0 en 20 % de NaCl, mejorando mediante la adición del 20-35% de NaCl. Se identificó a esta enzima como serín proteasa halófila relacionada con la quimiotripsina o la subtilisina que prefería el amino ácido isoleucina (Ile) en la posición P de los sustratos.

Porro *et al.*, 2003. En España aisló y caracterizó 26 cepas de halófilos moderados proteolíticos siendo estos miembros del género *Salinivibrio* (16 cepas), *Bacillus* (4 cepas), *Salinicoccus* (2 cepas) o miembros de la *γ-Proteobacteria* (4 cepas). La proteasa CPI de la cepa CP76 se seleccionó para estudios posteriores, por lo que se purificó y caracterizó bioquímicamente, revelando máxima actividad a 55 °C, pH 8,5 y alta

tolerancia a un amplio rango de concentraciones de NaCl de 0 a 4 M. La masa molecular de la proteasa purificada fue de 38 kDa y la secuencia de aminoácidos N-terminal determinada mostró similitud con las metaloproteasas descritas previamente. La actividad de la proteasa fue inhibida por EDTA, PMSF y Pefabloc y no se detectó inhibición significativa con E-64, bestatina, quimostatina o leupeptina. Se determinó que esta cepa es una *Pseudoalteromonas sp.* y que produce una metaloproteasa extracelular moderadamente termotolerante y estable a altas concentraciones de sal.

Choi *et al.*, 2001. En Corea realizó un estudio que compara tres técnicas zimográficas utilizando caseína, fibrina y gelatina como sustratos en SDS-PAGE, en base al patrón proteolítico de las enzimas extracelulares de tres cepas bacterianas de *Bacillus sp.* cepas DJ-1, DJ-2 y DJ-3. Evalúa la sensibilidad enzimática de su actividad en geles zimograma; y la estabilidad de los geles de zimograma teñidos con azul brillante de Coomassie en la solución de tinción. Los resultados no mostraron amplias diferencias en el patrón de enzimas extracelulares de las tres cepas. Las bandas en el gel de fibrina eran más claras, en el gel de gelatina se reveló la mayor sensibilidad enzimática, y en el gel de caseína apareció alrededor de 40-50 kDa un rastro que podría confundirse con una banda proteolítica.

1.1.2. NACIONALES

Flores-Santos *et al.*, 2019. Investigaron la producción y las propiedades de las proteasas extracelulares de *Barrientosiimonas sp.* cepa V9 obtenidas del agua de mar de Ventanilla, Callao. Para la determinación de las condiciones de cultivo de la proteasa se utilizaron fuentes de carbono y nitrógeno. La actividad proteolítica máxima alcanzó 1200 U mL⁻¹. El extracto enzimático mostró una actividad óptima a 60°C, pH 9.0, y fue estable de 30 a 50 ° C dentro de un rango de pH de 4.0 a 10.0 y una concentración de NaCl de hasta 2.5 M. La enzima fue estable en presencia de EDTA, urea, Triton X-100 y detergente (lauril sulfato de sodio como componente principal). La adición de dodecil sulfato de sodio al 1%, Tween-80 o Tween-20 aumentó la actividad en un 183% y 119% respectivamente, mientras que el β-mercaptoetanol redujo la actividad al 71%. El análisis de zimograma de caseína reveló tres zonas de hidrólisis que sugieren que *Barrientosiimonas sp.* V9 expresa proteasas con pesos moleculares de

aproximadamente 60, 45 y 35 kDa. *Barrientosiimonas sp.* V9 produce serina proteasas halotolerantes con gran potencial biotecnológico.

Del Maestro & Guzmán, 2015. Aislaron bacterias halófilas de estanques salinos de la caleta Santa Rosa - Lambayeque determinando la actividad amilolítica y proteolítica bajo condiciones óptimas de salinidad y pH. 24 muestras fueron tomadas de cada estanque y se enriquecieron en caldo marino al 4.5% de NaCl suplementado con extracto de levadura. Para determinar la actividad hidrolítica, se cultivaron las bacterias halófilas en agar marino al 10% de NaCl suplementado con caseína y almidón al 2%. La cepa MJ-67 encontró máxima actividad a 6% de salinidad y pH 7.0 frente a la caseína y la cepa MJ-80 frente al almidón a las mismas condiciones. Se identificaron como *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio* a las cepas MJ-1, MJ-67 y MJ-86 respectivamente.

Canales *et al.*, 2014. Aislaron bacterias halófilas provenientes de las salinas de Junín productoras de hidrolasas con actividad amilolítica. Estas fueron cultivadas medio SW complementado con 5% de NaCl, extracto de levadura y almidón. 14 bacterias pertenecientes al género *Halomonas* y *Bacillus* mostraron la capacidad de hidrolizar almidón. También determinaron la capacidad de hidrolizar proteasas, lipasas y nucleasas, mostrando actividades proteolíticas combinadas. Estas cepas capaces de hidrolizar almidón podrían ser de potencial uso en la industria.

Flores *et al.*, 2010. Aislaron bacterias halófilas moderadas de ambientes salinos de Pilluana, Huacho, Maras, Chilca, Paracas y Ventanilla y determinaron su capacidad hidrolítica sobre diferentes sustratos como Tween 80, aceite de oliva, almidón, caseína, lactosa y ADN. Se realizó la caracterización genotípica y se obtuvieron 12 géneros, las cepas L3CH y L2PAR hidrolizan la mayoría de sustratos y las cepas P2RI-17 y M17 solamente hidrolizan Tween 80.

Sánchez *et al.*, 2004. Evaluaron la actividad proteolítica de cepas de bacterias aisladas de agua de mar contaminadas en Paracas, Chancay y Callao. Fueron incubadas en agar

marino suplementado con caseína al 1% durante 72 horas a 25°C, 5 cepas de los géneros *Pseudomonas sp.* CM48, *Alcaligenes sp.* CM45 y *Aeromonas sp.* CM43, CM44 y CM46 revelaron halos de actividad y fueron evaluados para determinar la actividad proteolítica a diferentes concentraciones de NaCl, temperatura y pH. También evaluaron la actividad proteolítica específica sobre caseína, mostrando mejor actividad la cepa *Pseudomonas sp.* CM48 (17.38 U/mg).

1.1.3. LOCALES

Huaihua, 2019. Aisló *Staphylococcus sp.* provenientes de las salineras de Maras para la purificación, caracterización e inmovilización de sus enzimas proteolíticas. La actividad enzimática obtenida por los extractos de excreción en los medios MH y medio TSB fueron de 29.25 U/ml/min y 28.2 U/ml/min respectivamente. La técnica de electroforesis SDS-PAGE y zimograma copolimerizado con gelatina revelaron una proteasa de 60 kDa de peso molecular. El estudio de purificación de esta enzima se realizó mediante la técnica de cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Finalmente se confirmó que esta enzima es una metalo proteasa.

León, 2018. Determinó la actividad de proteasas extracelulares e intracelulares de las bacterias halófilas aisladas de dos manantiales salinos en los distritos de Acos y Huanoquite. Realizó la evaluación cualitativa de proteasas y obtuvo extractos de las proteasas extracelulares e intracelulares, posteriormente realizó la evaluación semicuantitativa de proteasas y cuantificó la concentración de proteínas de cada uno de los extractos crudos. Las cepas M3H159 y M3H1027 fueron las que mostraron actividad cualitativa al formar halos de actividad al hidrolizar gelatina, y en cuanto a su actividad semicuantitativa los extractos hidrolizaron la gelatina contenida en el medio de cultivo. La cepa M3H159 mostró mayor diámetro de halo y obtuvo actividad proteasa extracelular e intracelular con 4.65mm/μg de proteína y 18.9mm/μg de proteína respectivamente.

Gárate, 2016. Aisló bacterias halófilas provenientes de las salineras de Maras y caracterizó las enzimas proteolíticas. Seleccionó a las cepas N9 y N10 para evaluar su capacidad de hidrolizar distintos sustratos y obtener finalmente proteasas de excreción.

La actividad enzimática de la proteasa para la cepa N9 fue de 49.09 U/ml/min y 140 U/ml/min para la cepa N10. Los pesos moleculares de las proteasas se obtuvieron al realizar una electroforesis SDS-PAGE, siendo de 60.5 kDa, 47.2 kDa y 38.8 kDa para la N9 y 60.5 kDa y 47.2 kDa para la N10. Los extractos de excreción de las cepas fueron inhibidos por EDTA, PMSF y pepstatín A siendo así metalo, serín y aspártico proteasas respectivamente; y solo la cepa N10 presenta cisteín proteasas inhibidas por Leupeptín.

1.2. MARCO CONCEPTUAL

1.2.1. MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Se le denomina microorganismos extremófilos a aquellos que son capaces de sobrevivir en un ambiente extremo y esencial para algunos y desfavorable para otros microorganismos (Moreno *et al.*, 2009). Este ambiente presenta una amplia gama de condiciones extremas que incluyen temperaturas altas (55°C-121°C), temperaturas bajas (-2°C-20°C), alta salinidad (2-5M de NaCl), alta alcalinidad (pH mayor a 8), alta acidez (pH menor a 4) (Gomes & Steiner, 2004), alta presión, niveles de radiación o compuestos tóxicos, intensidad de luz, oxígeno y concentración de nutrientes, también pueden incluir condiciones inusuales de sobrevivencia en rocas muy debajo de la superficie o áreas secas con poca agua y nutrientes.

1.2.2. BACTERIAS HALÓFILAS

Los microorganismos halófilos conforman un grupo importante de extremófilos adaptados a vivir en diversos nichos hipersalinos, donde muestran un requerimiento óptimo de cloruro de sodio en los medios donde viven (Moreno *et al.*, 2009) como resultado producen enzimas activas y estables en concentraciones diferentes de sal y ambientes con baja actividad de agua (Daoud *et al.*, 2016).

1.2.2.1. CLASIFICACIÓN

Los microorganismos halófilos se han clasificado de acuerdo a las necesidades de NaCl, Kushner en 1978 clasifica a las bacterias halófilas incluyendo microorganismos no halófilos, halófilos débiles, halófilos moderados, halófilos extremos y halotolerantes, a partir de la cual varios autores realizan modificaciones en función del requerimiento de

porcentajes de NaCl (Ramírez et al, 2006; Delgado-García et al, 2012; Jácome, 2018).
En la Tabla 1 se muestra esta clasificación:

Tabla 1

Clasificación de las bacterias halófilas en base a la tolerancia de sal.

| Categoría | Descripción | Ejemplo |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| No halófilos | NaCl inferior a 0.2M (<1% p/v) | <i>Escherichia coli</i> |
| Halófilos débiles | NaCl: 0.2 - 0.5M (1 - 3% p/v) | <i>Tenuibacillus multivorans</i> |
| Halófilos moderados | NaCl: 0.5 - 3.5M (3 - 20% p/v) | <i>Salinivibrio costicola</i> |
| Límite de halófilo extremo | NaCl: 1.5 – 4 M (9 – 24 % p/v) | <i>Halorhodospira halophila</i> |
| Halófilos extremos | NaCl: 3.5 - 5.2M (20 - 32% p/v) | <i>Halobacterium salinarum</i> |
| Halotolerantes | En presencia o ausencia de altas concentraciones de NaCl. (Hasta 7.5% p/v) | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Fuente: Kushner, 1978; Ramírez *et al*, 2006; Delgado-García *et al*, 2012; Jácome, 2018

1.2.2.2. AMBIENTES SALINOS.

Los microorganismos halófilos son capaces de sobrevivir y prosperar en medios salinos e hipersalinos como sales de roca subterránea (Cojoc *et al*, 2009), salinas solares, lagos salinos naturales, sedimentos, lagos hipersalinos (Rasooli *et al*, 2016). Desde el punto de vista del origen de las grandes masas salinas, pueden estar clasificados en Atalasalino y Talasalino (Moreno *et al*, 2009).

- Atalasalino: Aquellos ambientes donde se originan por la evaporación del interior de las aguas superficiales continentales (Moreno *et al*, 2009).
- Talasalino: Se originan por la evaporación de agua de mar (Moreno *et al*, 2009).

1.2.3. ENZIMAS

Las enzimas actúan sobre las reacciones químicas como catalizadores biológicos, al participar en una reacción, estas no se consumen ni se alteran de manera permanente. Las enzimas pueden acelerar o incrementar de 10^{12} a 10^{20} veces la velocidad de las reacciones químicas respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente (Madigan & Oren, 2009). Las proteínas con actividad enzimática son la mayor parte de los catalizadores biológicos y representan el mayor y más diversificado grupo entre esas moléculas (Mathews *et al.*, 2002), a excepción de un pequeño grupo de moléculas de ARN que se dividen y empalman entre sí. Las enzimas son catalizadores selectivos y específicos para un sustrato único o conjuntos pequeños de sustratos relacionados estrechamente (Murray *et al.*, 2010).

1.2.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM) estableció un nombre y número de código único para cada enzima, por lo tanto, un sistema de nomenclatura. Según el tipo de reacción que catalizan (Murray *et al.*, 2010), las enzimas se clasifican en seis clases:

EC. 1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidación y reducción.

EC. 2. Transferasas: catalizan la transferencia de grupos funcionales tales como grupos metilo, glucosilo, fosforilo, acetilo, amino.

EC. 3. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis de enlaces como C-C, C-O y C-N

EC. 4. Liasas: catalizan la división de los enlaces de C-C, C-O y C-N mediante la eliminación del átomo dejando dobles enlaces.

EC. 5. Isomerasas: catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula

EC. 6. Ligasas: catalizan la unión de moléculas en reacciones acopladas a la hidrólisis de ATP, GTP, UTP, CTP.

1.2.3.1.1. HIDROLASAS

Son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, permite la escisión de un enlace químico por la acción del agua, poseen residuos cargados negativamente en la superficie de la proteína expuesta al disolvente para así mantenerse activa (Daoud *et al*, 2016). Estas enzimas han tenido importancia tecnológica por ser biocatalizadores.

1.2.4. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las proteasas hidrolizan enlaces peptídicos de las proteínas hasta descomponerlos en polipéptidos o aminoácidos libres. Se pueden clasificar en tres grupos siendo proteasas ácidas (categoría fungi, pH 2-5), neutras (organismos vegetales con pH 7) y alcalinas (No mayor a pH 8) (Alnahdi *et al*, 2012).

Constituyen el grupo más importante de enzimas industriales y representan el 60% en todo el mercado industrial, siendo de origen microbiano las dos terceras partes de las proteasas producidas comercialmente (Desai *et al.*, 2014).

Las proteasas emplean mecanismos de adaptación, estos poseen aminoácidos ácidos como glutamato y aspartato. Las cargas negativas de las proteínas se unen a cantidades de iones hidratados, reduciendo su hidrofobicidad superficial y disminuyendo la tendencia a agregarse a altas concentraciones de sal (Gomes & Steiner, 2004).

1.2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

- A. Serín proteasas: La serina (Ser) que está presente en su sitio activo realiza un ataque nucleofílico en el carbonilo del enlace peptídico, es decir que el residuo de Serina reacciona únicamente con un compuesto organofosforado. Las serín proteasas funcionan como activadores específicos del zimógeno plasmático, plasminógeno y constituyen un grupo de enzimas cuya síntesis y secreción celular están sujetas a modulación por una variedad de agentes que incluyen hormonas, compuestos cocarcinógenos y factores en la diferenciación celular (Heussen y Dowdle, 1980). Incluyen las quimiotripsinas, tripsinas, elastasas, trombinas, plasminas y subtilisinas.
- B. Cisteín proteasas: Su mecanismo catalítico involucra la formación de un intermediario enzimático acilado. El responsable del ataque nucleofílico es el grupo tiol reactivo de una cisteína (Cys) presente en el sitio activo. La actividad de toda cisteín proteasa depende de su diana catalítica que consiste en cisteína e histidina

(Mala *et al.*, 1998). Así se tiene a la papaverina, ficina y bromelina como cisteín proteasas.

- C. Metalo proteasas: Presentan un ion catiónico en su sitio activo, de carácter metálico que es el responsable de activar la molécula de agua para transformarla en un nucleófilo. Se inhiben en presencia de agentes quelantes, tal es el caso del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los cationes más frecuentes son el zinc (Zn^{2+}), seguido de Cobalto y Manganeso. Forman una estructura tetraédrica en su sitio activo, constituido generalmente por histidina, seguido de glutamina (Gln), ácido aspártico o cisteína. Las carboxipeptidasas, aminopeptidasas y dipeptidasas son metaloproteasas.
- D. Aspártico proteasas: Denominadas también proteasas ácidas. Poseen dos residuos de aspartato muy conservados en su sitio activo. El grupo nucleofílico es una molécula de agua que se desprotona al ser atacada por un residuo aspártico del sitio activo (Mala *et al.*, 1998). La mayoría de las proteasas aspárticas presentan actividad máxima a pH entre 3 a 4. Se tiene como ejemplo la pepsina y la renina.

1.2.5. INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas son proteínas o péptidos capaces de inhibir la actividad catalítica de las enzimas proteolíticas. Estos están ampliamente distribuidos en animales, microorganismos y plantas (Lingaraju, 2008). La importancia de estas moléculas radica en su función fisiológica, la que está dirigida a la regulación de la actividad proteolítica (Hugli, 1996) y a partir de éstas elaborar nuevas sustancias para diferentes aplicaciones, biotecnológicas y biomédicas, entre estas el control de enfermedades y procesos patológicos (Leung *et al.*, 2000). La mayoría de los inhibidores actúan con su propia proteasa a través del sitio activo.

1.2.5.1. TIPOS DE INHIBIDORES

- A. EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético): Es un conocido agente quelante (Janecki & Reilly, 2005), principal inhibidor de la actividad enzimática de metalo proteasas (Bellido, 2016). Su peso molecular es de 292.24 g/mol, siendo efectivo a una concentración de 1-10 mM y estable por meses a pH 8.5 a 4 °C.

- B. PMSF (Phenylmethyl Sulphony Fluoruro): Es un inhibidor que reacciona con residuos de serina y provoca la inhibición irreversible de la enzima. También reaccionan débilmente con otras enzimas como las esterasas, por ejemplo, la acetilcolinesterasa (Akbarabadi *et al.*, 2021). El PMSF es el inhibidor menos selectivo pero el más utilizado como inhibidor de las Serín proteasas. Es soluble en agua por lo que su inactivación se da con el aumento de pH y temperatura, siendo de una hora y media la vida media del inhibidor a 25°C y pH 7 (James, 1978). Su peso molecular es de 174.19g/mol.
- C. E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano). Es un epóxido aislado por primera vez de *Aspergillus japonicus* (Hanada, 1978). E-64 ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor potente e irreversible (tipo covalente) para muchas cisteínoproteasas como papaína, ficina, actinidina, catepsina B y L (Matsumoto *et al.*, 1999). Su peso molecular es 357.41g/mol y es estable por 7 días a pH neutro a 20 °C.
- D. Pepstatín A: Es un pentapéptido con secuencia isovaleril-L-valil-L-valil-estatil-L-alanil-estatina, encontrado en filtrados de cultivo de varias especies de *Actinomyces testaceus* (Umezawa *et al.*, 1970). Es un inhibidor natural, potente, específico y reversible de las aspártico proteasas como pepsina (Purushothaman *et al.*, 2021). Su peso molecular es 685.9 g/mol.
- E. Leupeptín: Es un inhibidor reversible y competitivo de la serina proteasa, , inhibidor de la catepsina B (cisteín proteasa), inhibidor de las calpaínas (proteasas activadas por calcio que promueven la muerte celular) e inhibidor de tripsina, y por lo general es referido a un estado de transición análogo. La concentración sugerida es de 1-10 µM y su peso molecular es de 426.6 g/mol.

1.2.6. DIVERSIDAD DE BACTERIAS HALÓFILAS CON ACTIVIDAD PROTEASA

Las bacterias halófilas son capaces de producir enzimas con actividad hidrolítica como son las proteasas. Muchos géneros poseen actividad proteasa. Así tenemos a *Bacillus* (*B. cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. mojanensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*) que posee una importante fuente de proteasas únicos en comercialización de producción de proteasas, se

encuentran en el suelo y agua, toleran condiciones de ambientes extremas y son altamente alcalinas (Alnahdi *et al.*, 2012); *Halobacillus sp* (Daoud *et al.*, 2016), *Halorhodospira*, *Halovibrio*, *Halospina*, *Salicola*, *Salinibacter* (Moreno *et al.*, 2009), *Salinibacter ruber* (Gomes & Steiner, 2004) y *Halomonadaceae*.

1.2.7. APLICACIÓN DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA

El uso de proteasas de bacterias halófilas en la industria abarca muchos estudios. Las proteasas bacterianas representan el 20% de las enzimas del mercado mundial y son la mayor promesa, por la utilidad que podrían tener. Estas enzimas adquieren mucha importancia en diversas aplicaciones como en la industria curtidos de cueros, detergentes, alimentos y productos farmacéuticos, tratamientos de residuos e industria fotográfica. (Gupta *et al.*, 2002).

Las bacterias producen solutos compatibles como betaína y ectoína. Debido a la supervivencia de los microorganismos halófilos en entornos salinos, estos tienen capacidades en diversos campos de la biotecnología como las bacteriorodopsinas que tienen aplicaciones en holografía, moduladores ópticos, calculadoras y memorias ópticas (Rasooli *et al.*, 2016).

En cuanto a la producción de alimentos se tiene como ejemplo el queso, vino, cerveza y vinagre (Kirk *et al.*, 2002).

La tecnología enzimática ha sido estimulada por los avances en biología molecular y computación, nuevas fuentes de enzimas y la ingeniería bioquímica. Los cambios en la biología molecular están conduciendo al desarrollo de miles de nuevos usos de tecnología enzimática impulsando su crecimiento (Gomes & Steiner, 2004).

El avance de las aplicaciones industriales y biomédicas de exoenzimas de organismos extremófilos cada vez está creciendo y es una fuente de inversión para las empresas dedicadas a ese rubro.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio no tiene un área geográfica como tal porque se limita al estudio de bacterias halófilas que han sido aisladas en investigaciones previas. Estas cepas, ML106512, M3H1027 y M4H153D provienen de los salares del distrito de Acos y Huanquite.

La parte experimental del estudio se llevó a cabo en el laboratorio 302 de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y en el laboratorio de “Genética y Biotecnología Microbiana” que se encuentra en el primer piso del edificio de Control de Calidad de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

2.2. MATERIALES

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en la parte experimental de este proyecto fueron las 3 cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D de bacterias halófilas criopreservadas aisladas de los salares del distrito de Huanquite y del distrito de Acos durante la ejecución previa de proyectos. Las cepas M3H1027 y ML106512 fueron aisladas en el 2015 durante la ejecución del proyecto “Secuenciación del metagenoma de ambientes salinos del departamento de Cusco” y la cepa M4H153D fue aislada el 2018 durante la ejecución del proyecto “Inhibición de proteasas de *Leishmania* a través de péptidos obtenidos de proteínas de *Lupinus mutabilis* por acción enzimática de proteasas de bacterias halófilas: Nuevas perspectivas de búsqueda de moléculas antileishmanicidas”

Tabla 2

Cepas de bacterias halófilas utilizadas en el estudio

| Código de las cepas | Procedencia | Año de aislamiento |
|---------------------|-------------|--------------------|
| ML106512 | Acos | 2015 |
| M3H1027 | Huanquite | 2015 |
| M4H153D | Huanquite | 2018 |

2.2.2. MATERIALES DE LABORATORIO

2.2.2.1. MATERIALES DE VIDRIO

- Placas Petri 100mm x 20mm
- Frascos de vidrio con tapa rosca 50ml, 250ml y 1000ml
- Probetas graduadas 100ml, 250ml y 500ml
- Matraces Erlenmeyer 100ml, 250ml, 500ml y 1000ml

2.2.2.2. EQUIPOS

- Incubadora (Marca: Memmert Bock)
- Autoclave (Marca: Greetmed)
- Microcentrífuga (Modelo Minispin, Marca: Eppendorf)
- Baño María (Thermo Scientific)
- Baño de agua con agitación (Marca: Thermo Scientific)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Micropipetas de 0.5-10 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l (Sartorius)
- Espectrofotómetro (Marca: Jasco, Modelo: V-630 Bio)
- Refrigeradora (Indurama)
- Congelador (Mabe)
- Cámara de electroforesis (Marca: Cleaver)
- Fuente de poder (Marca: Cleaver)
- Digitalizador de imágenes (BioRad)

2.2.2.3. REACTIVOS

- Ácido tricloracético (Sigma)
- Reactivo de Bradford (Sigma)
- Tritón X-100 (Sigma)
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Merck)
- Acrylamida (Sigma)
- Bisacrilamida (Sigma)
- Buffer Tris 1.5M pH 7.4
- Buffer Tris 0.5M pH 6.4
- Persulfato de amonio (APS) (Sigma)

- Glicina (Merck)
- B-mercaptoentanol (BIORAD)
- N-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Invitrogen)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Pepstatin (Merck)
- Leupeptin (Merck)
- E-64 (Merck)
- Azul de Coomasie R-250 (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Ácido acético glacial solución stock (Panreac)
- Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo scientific)

2.2.2.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio Sea Water agar y líquido.
- Medio de cultivo con gelatina
- Medio de cultivo con caseína

2.2.2.5. OTROS MATERIALES

- Asas y agujas de siembra
- Mechero Bunsen
- Gradillas
- Puntas para micropipetas 1-10 μ l, 10-100 μ l y 100-1000 μ l
- Filtros de jeringa estériles 0.45 μ m
- Jeringas de 5 y 10 ml
- Tubos de microcentrifuga 1.5ml
- Tubos de centrifuga de 25 ml y 50 ml
- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla
- Papel toalla
- Papel craft

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS.

2.3.1.1.MEDIO SEA WATER (SW): El medio que se utilizó para el cultivo de bacterias halófilas fue el medio líquido SW modificado por Ardakani *et al.*, 2012. En la Tabla 3 se indica la composición del medio SW, el mismo que se suplementa con NaCl a la concentración que se desea. Para los experimentos realizados, el medio SW se suplementó 10% NaCl. Cuando se desea preparar agar SW, se agrega agar bacteriológico al 2% (p/v).

Tabla 3

Composición del medio “sea water” (SW)

| Reactivo | Cantidad (g/l) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| NaCl | 100 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 9.6 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 7.0 |
| KCl | 2.0 |
| CaCl ₂ | 0.36 |
| NaHCO ₃ | 0.06 |
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona | 5.0 |
| Glucosa | 1.0 |
| Agua destilada | La cantidad necesaria para 1000 ml |

Fuente: Ardakani *et al.*, 2012

2.3.1.2.MEDIO DE CULTIVO CON GELATINA:

Para evaluar la actividad proteolítica de las bacterias halófilas en estudio, se utilizó como sustrato a la gelatina. Al medio SW que se utiliza como base, se suplementó con 10% o 15% de NaCl y se añadió 1% de gelatina (Cojoc *et al.*, 2009). Se disolvió y calentó a 60°C y posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. En la Tabla 4 se muestra un ejemplo de SW al 10% de NaCl con gelatina al 1%.

Tabla 4*Composición del medio de cultivo con gelatina*

| Reactivo | Cantidad |
|------------|----------|
| SW líquido | 1000 ml |
| Agar | 20 g/l |
| Gelatina | 10 g/l |

Fuente: Cojoc *et al.*, 2009

2.3.1.3. MEDIO DE CULTIVO CON CASEÍNA: Se utilizó el agar leche descremada para este medio. La caseína es la proteína que se encuentra en la leche, cuando se utiliza en el medio de cultivo esta le confiere el color blanco característico. Se utilizó el medio sólido SW suplementado con leche descremada en polvo al 1% (Cojoc *et al.*, 2009). Se preparó una solución acuosa al 10% de leche descremada en polvo y se esterilizó a 121°C durante 5 minutos. Se dejó enfriar a 55°C y se agregó el medio SW suplementada con 10% o 15% de NaCl que fue esterilizada previamente a 121°C durante 15 minutos, fundida y enfriada a 55°C, se mezcló bajo esterilidad y se procedió a distribuir en placas Petri.

Tabla 5*Composición del medio de cultivo con caseína para 100ml*

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------|----------|
| SW líquido | 90 ml |
| Agar | 20g/l |
| Leche descremada en polvo | 10ml |

Fuente: Cojoc *et al.*, 2009

2.3.2. REACTIVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS HALÓFILAS

Las cepas de bacterias halófilas que fueron aisladas y criopreservadas en investigaciones realizadas previamente, se reactivaron en medio SW líquido y se incubaron a 30°C por 48

horas. El rango de concentración de sal que permite el crecimiento bacteriano varía entre 10-15%.

2.3.3. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para evaluar la actividad proteolítica cualitativa se utilizaron dos medios de cultivo, el primero de ellos se trata del agar gelatina y el segundo el agar caseína.

2.3.3.1.HIDRÓLISIS DE GELATINA.

La gelatina está compuesta de una proteína sencilla derivada de la hidrólisis del colágeno, las gelatinasas son las enzimas que hidrolizan la gelatina causando la licuefacción del medio de cultivo (Yu *et al.*, 2016). Se usa para detectar la actividad proteolítica que causan las bacterias en crecimiento.

Para evaluar cualitativamente la actividad proteolítica de las cepas bacterianas en estudio, se utilizaron cultivos de 48 horas de crecimiento. El medio de cultivo utilizado es el medio SW suplementado con gelatina al 1% (Cojoc *et al.*, 2009). La preparación del medio se indica en el apartado 2.3.1.2. Luego se sembraron por estrías los cultivos de las cepas de bacterias halófilas e incubaron durante 7 - 9 días a 26°C. Finalizado el periodo de incubación se inundó la superficie del medio con ácido tricloroacético al 10% (Pitt & Dey, 1970). La presencia de zonas claras alrededor del inóculo mostró la hidrólisis de la gelatina.

2.3.3.2.HIDRÓLISIS DE CASEÍNA

Sobre este sustrato los microorganismos degradan las proteínas en aminoácidos y péptidos. La caseína le proporciona color blanco al sustrato. La hidrólisis de la caseína se indica por la presencia de un halo transparente alrededor del cultivo de bacterias halófilas (Garate, 2016).

El medio sólido SW suplementado con leche descremada en polvo al 1% (Cojoc *et al.*, 2009) se utilizó para este método. La preparación del medio de cultivo se indica en el apartado 2.3.1.3. Se inoculó el cultivo de bacterias halófilas e incubó a 26°C durante 5 días. Se realizaron las mediciones del halo de hidrólisis de caseína a las 48 horas durante 5 - 6 días por intervalos de tiempo de 24 horas.

2.3.4. PRODUCCIÓN EN MASA DEL CULTIVO DE BACTERIAS HALÓFILAS

A partir de un cultivo de bacterias halófilas, se inoculó 100µl de este caldo en 5ml de medio SW líquido suplementado con 10% y 15% de NaCl y se incubó a baño María durante 48 horas con agitación constante.

2.3.5. RECUPERACIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES

Las proteasas extracelulares se obtuvieron a partir del cultivo en masa de las bacterias halófilas. Al finalizar el periodo de incubación, se recogió el cultivo en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para separar todas las células y fragmentos celulares y se filtró el sobrenadante a través de filtros estériles de 0.45 µm de diámetro en tubos de centrifuga de 15ml. La muestra obtenida fue denominada como extracto crudo de enzimas que constituye la fuente de proteasas extracelulares.

2.3.6. RECUPERACIÓN DE PROTEASAS INTRACELULARES

A partir de un cultivo en masa de bacterias halófilas se obtuvo las proteasas intracelulares. Finalizando este periodo de incubación, se recogió el cultivo en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos para obtener el sobrenadante manteniéndose el precipitado celular. Se añadió 200 µl de PBS estéril con el objetivo de lavar cualquier proteína que haya quedado en el ambiente extracelular y centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante para realizar un segundo lavado con 200 µL de PBS en condiciones estériles y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y agregó 100 µl de PBS estéril para realizar un shock térmico que provoca una lisis celular a dos ciclos de cambios bruscos de temperatura a -20°C y 37°C por 2 minutos cada una durante 5 ciclos. Al cabo de ese periodo de tiempo se agregó 1 ml de PBS estéril y centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos. Filtrar el sobrenadante mediante filtros estériles de 0.45 µm de diámetro y la muestra obtenida se denominó como extracto intracelular. Este método fue estandarizado en el laboratorio.

2.3.7. EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE PROTEASAS EXTRACELULARES DE BACTERIAS HALÓFILAS.

La determinación semicuantitativa de la actividad de proteasas extracelulares se realizó con las muestras de extracto extracelular de proteasas obtenidas previamente de las cepas

M3H1027, ML106512 y M4H153D. Este método se evaluó en placas Petri conteniendo medio de cultivo SW suplementado con gelatina o caseína, y en el centro de las placas se realizó un agujero con ayuda de un sacabocados estéril de 0.8 cm de diámetro, se inoculó 100 µl del extracto crudo de proteasas extracelulares de las cepas en estudio, se incubó durante 7 – 9 días cuando el sustrato utilizado fue gelatina, y durante 6 días cuando el sustrato fue caseína, finalmente la actividad proteolítica se reveló inundando el medio con ácido tricloroacético al 10%, observando la actividad proteolítica extracelular con la aparición de una zona clara alrededor de los pocillos y estimando el diámetro formado por los halos de hidrólisis de caseína y gelatina. El diámetro de los halos de hidrólisis en el sustrato caseína se estimó cada día para observar el progreso del crecimiento.

2.3.8. EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE PROTEASAS INTRACELULARES PRODUCIDAS POR BACTERIAS HALÓFILAS.

Para la determinación semicuantitativa de proteasas intracelulares se utilizó el extracto de proteasas intracelulares de bacterias halófilas que mostraron actividad proteolítica hidrolizando gelatina y caseína. Este método se evaluó en placas Petri conteniendo medio de cultivo SW al cual se le agregó gelatina o caseína como sustrato y en el centro de las placas se realizó un agujero con un sacabocados estéril de 0.8 cm de diámetro, se inoculó 100 µl del extracto crudo de proteasas intracelulares de las cepas en estudio, se incubó durante 7 - 9 días para el sustrato gelatina y 6 días para el sustrato caseína, se reveló la actividad proteolítica inundando el medio con ácido tricloroacético al 10%, se observó la producción de proteasas intracelulares con la aparición de una zona clara alrededor de los pocillos y finalmente se estimó el diámetro formado por los halos de hidrólisis de caseína y gelatina.

2.3.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES E INTRACELULARES.

La cuantificación de la concentración de proteínas del extracto extracelular e intracelular se determinó según el método de Bradford, 1976. Esta técnica consiste en la formación del complejo colorante-proteína, el colorante es el azul de Coomassie G-250. Esta unión origina un color azul característico como consecuencia del acercamiento de la proteína con el colorante que inicialmente presenta un color pardo por la presencia del ácido fosfórico. Este método es sensible, capaz de captar de 1 a 15 µg de proteína, es simple,

rápido, y con pocas sustancias que interfieren en su determinación. Se siguió el procedimiento que se encuentra en el Anexo N°1.

2.3.10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica esencial que determina el peso molecular de las proteínas a través de la separación en una matriz inerte compuesta por acrilamida y bisacrilamida al aplicar corriente eléctrica constante y con ayuda de estándares de peso molecular comerciales. El límite de determinación del peso molecular es de 10 kDa. Este método es probablemente el más utilizado, utiliza un detergente denominado dodecilsulfato de sodio SDS-PAGE. En la técnica de SDS-PAGE, las proteínas se unen al detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. El gel separador será al 10% y el gel compactador al 5%. Se siguió la técnica realizada por Laemmli en 1970 con algunas modificaciones (Anexo N°2). Se utilizó el sistema de electroforesis Cleaver para mini geles. Para determinar los pesos moleculares de las muestras se utilizó el marcador de peso molecular:

- Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo scientific): β -galactosidasa de 116.0 kDa, albumina de suero bovino de 66.2 kDa, Ovoalbúmina de 45.0 kDa, Lactato deshidrogenasa de 35.0 kDa, Bsp981 Rasa de 25.0 kDa, β -lactoglobulina de 18.4 kDa y lisozima de 14.4 kDa.

2.3.11. ZIMOGRAMA COPOLIMERIZADO CON GELATINA

El método de zimografía es utilizado para detectar la actividad de enzimas proteolíticas posterior a la electroforesis. Esta técnica se basa en la copolimerización de los geles de SDS-PAGE con algún sustrato, el que es degradado por la proteasa recuperada durante el periodo de incubación en un buffer después de la separación electroforética (Seung-Ho *et al.*, 1998). La actividad en zimograma se observa mediante la visualización de zonas claras, donde se han degradado el sustrato.

Se prepararon geles de poliacrilamida en las mismas condiciones que una electroforesis discontinua, incorporando gelatina al 0.1 % (Gárate, 2016) al gel separador o de resolución. Se sembraron 20 μ l de las muestras en condiciones no reductoras, es decir sin desnaturalizar en calor y sin la aplicación de β -mercaptoetanol. La electroforesis se realizó a 90 voltios por 3 horas y 30 minutos. Al finalizar ese periodo de tiempo se lavaron los

geles con tritón X100 al 1 % durante 30 minutos para retirar el SDS y dos veces con agua bidestilada para retirar el tritón. Posteriormente, los geles fueron incubados en buffer de zimograma a 37°C durante 12-14 horas. Se decantó el buffer y lavó con agua destilada durante cinco minutos y luego se dejó coloreando con solución de azul de Coomasie R-250 durante 12-14 horas en agitación constante.

2.3.12. MÉTODOS DE INHIBICIÓN

El método de inhibición se basa en identificar a las proteasas de las cepas en estudio utilizando inhibidores enzimáticos. En este estudio se utilizaron los siguientes inhibidores (Tabla 6):

Tabla 6

Inhibidores de proteasas

| Inhibidor | Proteasa donde actúa | Concentración del inhibidor |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| EDTA | Metalo proteasa | 5mM |
| Pepstatín A | Aspártico proteasa | 1µM |
| Leupeptín | Serín y cisteín proteasa | 1µM |
| E-64 | Cisteín proteasa | 1-10mM |

Fuente: Janson & Rydén, 2008

Una vez que la electroforesis culminó, se lavó el gel con tritón X-100 durante 30 minutos para retirar el dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2 veces con agua destilada para eliminar el exceso de tritón X-100. Se incubó en una solución de agua destilada incorporando las concentraciones del inhibidor que se muestran en la Tabla 6 durante 12-14 horas. Al finalizar el periodo de incubación se dejó colorear con la solución de azul de Coomasie R-250 durante 12-14 horas.

2.3.13. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para determinar la temperatura en la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se utilizó la técnica estudiada por Karbalaeei-Heidari *et al.* en 2007 con algunas modificaciones, se realizó un zimograma copolimerizado con gelatina, la metodología se describe en la sección 2.3.11. Para observar la actividad enzimática se

incubaron los geles a varias temperaturas (4°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° Y 80°C) durante 30 minutos. Los valores se expresaron cualitativamente.

2.3.14. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para determinar el pH en la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se realizó un zimograma copolimerizado con gelatina, la metodología se muestra en la sección 2.3.11. Se utilizaron diferentes tampones utilizando valores de pH que van desde pH 5.0 a 11.0. Para la preparación de las soluciones del sustrato que se emplean en este ensayo se seleccionaron los siguientes cuatro sistemas buffers: acetato de sodio 0.1M (pH 4.0-5.5), fosfato de sodio 0.1M (pH 6.0-7.5), Tris-HCl (pH 8.0-9.0) y glicina-NaOH (pH 9.5-11.0). Finalmente, para observar la actividad, se determinó mediante incubación de los geles en los diferentes sistemas buffer durante 30 minutos a 30°C. Los valores se expresarán cualitativamente.

2.3.15. EFECTO DE NaCl EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para determinar el efecto de sal en la actividad proteasa de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D, se realizó un zimograma copolimerizado con gelatina, metodología descrita en el apartado 2.3.11. y posteriormente para revelar la actividad enzimática, los geles se incubaron en buffer zimograma en presencia de 0, 10 y 20% de NaCl. Los valores se expresaron cualitativamente.

2.3.16. EFECTO DE IONES METÁLICOS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para evaluar el efecto de los metales iónicos en la actividad proteasa de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se realizó un zimograma copolimerizado con gelatina, el protocolo está descrito en el apartado 2.3.11. Para revelar la actividad enzimática, los geles se incubaron en el buffer zimograma con cada uno de los iones metálicos por 30 minutos a 30°C. Los metales probados fueron Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Mn^{2+} en presencia de 5mM de cada ion bajo ensayo estándar (Karbalaei-Heidari *et al.*, 2007). La actividad se determinó cualitativamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS HALÓFILAS

Los resultados de la recuperación de cepas M4H153D, M3H1027 y ML106512 utilizadas durante esta investigación se muestran en la Tabla 7. Se inocularon las cepas que se encontraban en criopreservación en 1 ml de medio SW líquido suplementado con 10 y 15% de NaCl. Cada uno de estos cultivos se incubó a 30°C durante 48 y 120 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se reveló el crecimiento observando la turbidez de los medios indicando el crecimiento bacteriano.

Tabla 7

Crecimiento de cepas de bacterias halófilas recuperadas para este estudio.

| Código de las cepas | Concentración NaCl (%) | Crecimiento | |
|---------------------|------------------------|-------------|--------|
| | | 48 hrs | 120hrs |
| M4H153D | 15 | + | |
| M3H1027 | 15 | + | |
| ML106512 | 10 | | + |

Recuperación de la cepa (cultivo positivo) = +

Karbalaei *et al.*, en 2007, evaluaron el crecimiento de *Salinivibrio sp.* cepa AF-2004 en un medio basal que contenía peptona, extracto de carne y NaCl y se cultivó a 32°C durante 48 horas, esta cepa creció bien a diversas concentraciones de sal en un rango del 1 al 17% siendo el crecimiento óptimo a 5%. León, en el 2018, utilizó el medio SW suplementado con 15 % de NaCl para evaluar el crecimiento de las cepas M3H1027 y ML106512, obtuvo un crecimiento óptimo a 30°C durante 48 horas. Al comparar con nuestros resultados se observa que la cepa ML106512 obtuvo un crecimiento lento a pesar de que se utilizó el mismo medio de cultivo, es decir que en el actual trabajo el crecimiento óptimo es al 10% de NaCl ya que cuando se descongeló la cepa no hubo crecimiento al 15% NaCl. Cabe indicar que este proyecto es una continuación del seminario de investigación realizado por León, en el 2018.

3.2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica cualitativa de las cepas M4H153D, M3H1027 y ML106512 se evaluó utilizando como sustrato gelatina al 1% y leche descremada al 1% en el medio de cultivo SW sólido.

3.2.1. PRUEBA PROTEOLÍTICA UTILIZANDO COMO SUSTRATO GELATINA

La determinación de la actividad proteolítica cualitativa de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en placas Petri que contienen como sustrato gelatina al 1% fue ensayada en medio SW al 10 y 15% de NaCl, y se observaron halos de actividad de 6.52 mm, 6.66mm y 14.97 mm respectivamente. Estos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Actividad cualitativa de proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en sustrato gelatina.

| Cepa | Presencia de halo | Concentración NaCl (%) | Halo (mm) |
|----------|-------------------|------------------------|-----------|
| M3H1027 | + | 10 | 6.52 |
| ML106512 | + | 10 | 6.66 |
| M4H153D | + | 15 | 14.97 |

+ = Actividad proteolítica presente

Las pruebas de hidrólisis se revelaron a los 9 días de incubación. Este ensayo sugiere mayor producción en la cepa M4H153D con un diámetro de halo de hidrólisis de 14.97 milímetros. Esta cepa fue evaluada cualitativamente en un medio de cultivo SW suplementado con 15% de NaCl, lo que sugiere que la composición del medio podría influir en la producción de proteasas.

3.2.2. PRUEBA PROTEOLÍTICA UTILIZANDO COMO SUSTRATO CASEÍNA

La evaluación de la proteólisis cualitativa fue realizada utilizando como sustrato leche descremada al 1% en un medio de cultivo SW suplementado con 10 y 15% de NaCl. Las pruebas se revelaron en tiempos diferentes, a los 2, 3, 4, 5 y 6 días. Los resultados se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9

Actividad cualitativa de proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en sustrato caseína.

| Cepa | Presencia de halo | Halo (mm) | | | | |
|----------|-------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | | 2° día | 3° día | 4° día | 5° día | 6° día |
| M3H1027 | + | - | 1.2 | 2.7 | 3.5 | 5.6 |
| ML106512 | + | - | - | 0.77 | 1.83 | 2.28 |
| M4H153D | + | - | 0.71 | 1.44 | 1.94 | 5.1 |

+ = actividad proteolítica presente; - = ausencia de la actividad proteolítica

La cepa M4H153D también sugiere mayor diámetro de halo de hidrólisis promedio de 5.1 mm luego de 6 días de incubación. Este experimento permitió observar el incremento de la actividad de proteasas directamente proporcional al tiempo de incubación. Una característica importante que podemos observar en esta prueba es la capacidad de las proteasas de estas bacterias de mantener su actividad hasta los 6 días de incubación a 30°C, lo cual indica la estabilidad de las proteasas a tiempos largos de incubación.

La actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se observó con los sustratos gelatina y caseína, tal como se mostraron en las Tablas 8 y 9; sin embargo, los halos de actividad fueron de mayor diámetro cuando el sustrato fue gelatina, lo cual indica la discriminación a nivel de sustrato que tienen las proteasas de las cepas en estudio. Esta característica también fue observada en cepas de *Bacillus sp* EHM reportada por Alnahdi *et al.* (2012). Son estos resultados se demuestra la actividad gelatinolítica que tienen las cepas de bacterias halófilas evaluadas en el presente estudio.

3.3. EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

La evaluación semicuantitativa de la actividad proteolítica extracelular se evaluó en sustrato gelatina y caseína.

3.3.1. PRUEBA PROTEOLITICA EN GELATINA

Para la determinación de la actividad semicuantitativa extracelular se siguió la metodología del apartado de Materiales y Métodos 2.3.7. Se obtuvo el extracto extracelular de proteínas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

La actividad de proteasas se reveló después de 7 días de incubación. El extracto total de proteínas de las cepas en estudio se inoculó en pozos de 0.8 -1 cm de diámetro en placas conteniendo medio SW suplementado con 1% de gelatina y NaCl al 10% y 15%. Los resultados se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10

Diámetro de halo de hidrólisis de proteasas extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D en medio con sustrato gelatina.

| Cepa | NaCl (%) | Presencia de halo | Halo (mm) |
|----------|----------|-------------------|-----------|
| M3H1027 | 10 | + | 6.32 |
| ML106512 | 10 | + | 8.41 |
| M4H153D | 15 | + | 15.87 |

+ = actividad proteolítica presente

El extracto extracelular de la cepa M4H153D alcanzó un diámetro de hidrólisis promedio de 15.87 milímetros luego de 7 días de incubación lo que sugiere que mostró mayor halo de hidrólisis en comparación a las cepas M3H1027 y ML106512 que alcanzaron diámetro de hidrólisis de 6.32 y 8.41 milímetros respectivamente. Estos resultados demuestran que las cepas son capaces de producir extractos extracelulares que hidrolizan gelatina contenida en el medio de cultivo, ya que, se manifiesta la formación del halo de hidrólisis. A su vez podemos observar la capacidad de mantener la actividad proteolítica hasta los 7 días de incubación a 30°C.

Garate en 2016 obtiene proteasas extracelulares a partir de las cepas N9 y N10, utilizó el sobrenadante del cultivo y estas proteasas fueron capaces de hidrolizar gelatina obteniendo así halos de hidrólisis alrededor de los pocillos. León, en 2018 mostró la actividad proteolítica semicuantitativa presente en la cepa M3H1027.

3.3.2. PRUEBA PROTEOLITICA EN CASEÍNA

La actividad semicuantitativa de proteasas extracelulares se evaluó también en sustrato caseína, para esta prueba se siguió el apartado 2.3.7.de Materiales y Métodos.

Los extractos extracelulares se inocularon en pozos de 0.8 a 1 cm de diámetro en placas conteniendo medio SW suplementado con 1% de leche descremada. Los resultados se evaluaron en diferentes tiempos de incubación, a los 2, 3, 4, 5 y 6 días; estos se observan en la Tabla 11. El extracto extracelular de la cepa M3H1027 alcanzó un diámetro de hidrólisis 2.48 milímetros luego de 6 días de incubación; el extracto extracelular de la cepa ML106512 alcanzó un diámetro de halo 4.55 milímetros después de 6 días de incubación y el extracto extracelular de la cepa M4H153D alcanzó un diámetro de halo promedio de 2.59 milímetros.

Tabla 11

Diámetro de halo de hidrólisis de proteasas extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D en medio con sustrato caseína.

| Cepa | Presencia de halo | Halo (mm) | | | | |
|----------|-------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | | 2° día | 3° día | 4° día | 5° día | 6° día |
| M3H1027 | + | - | 0.9 | 1.26 | 1.69 | 2.48 |
| ML106512 | + | 2.24 | 2.71 | 3.44 | 3.88 | 4.55 |
| M4H153D | + | - | - | 0.71 | 1.66 | 2.59 |

+ = actividad proteolítica presente; - = ausencia de la actividad proteolítica

El halo de hidrólisis del extracto extracelular de la cepa M3H1027 producido al 6° día de incubación fue de 2.48 mm; en cambio el halo de hidrólisis del extracto extracelular de la cepa ML106512 al 6° día de incubación fue de 4.55 mm; y el halo de hidrólisis del extracto extracelular de la cepa M4H153D producido al 6° día fue de 2.59 mm. Las cepas M3H1027 y M4H153D mostraron halos de hidrólisis después de 2° o 3° día, esto podría sugerir que estas cepas no producen proteasas extracelulares a corto tiempo o que tienen baja actividad proteolítica. Estas diferencias sugieren que estas cepas son capaces de formar halos de hidrólisis en sustrato caseína a corto tiempo, como se pudo observar desde el día 2 la presencia de varias proteasas o a la alta actividad de alguna de ellas. Además,

se realizó este ensayo con el objetivo de diferenciar la producción de los halos de hidrólisis con el sustrato gelatina, ya que estos se observan al finalizar los 7 días de ensayo al revelar con ácido tricloroacético al 10%, en cambio en el sustrato caseína los halos de hidrólisis se observan fácilmente cada día hasta el 6° día de ensayo.

3.4. EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA INTRACELULAR

3.4.1. PRUEBA PROTEOLITICA EN GELATINA

Para la determinación de la evaluación semicuantitativa de proteasas intracelulares se siguió el apartado 2.3.8. de materiales y métodos. El tiempo de incubación fue de 9 días. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Se demuestra la actividad de proteasas intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 Y M4H153D.

Tabla 12

Actividad semicuantitativa de proteasas intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en medio con sustrato gelatina

| Cepa | Presencia de halo | Diámetro de halo (mm) |
|----------|-------------------|-----------------------|
| M3H1027 | + | 1.37 |
| ML106512 | + | 3.03 |
| M4H153D | + | 4.81 |

+ = actividad proteolítica presente

La cepa M4H153D muestra un halo de hidrólisis mayor que las cepas M3H1027 y ML106512 después de 9 días de incubación, lo cual estaría relacionado a la presencia de varias proteasas o a la alta actividad de alguna de ellas. Por tratarse de una prueba semicuantitativa del extracto total intracelular, no se puede precisar el origen de esta actividad. Por otro lado, se observa que las actividades proteolíticas de las tres cepas son menores en comparación con la actividad de los extractos extracelulares, este resultado podría deberse a la menor concentración de proteínas intracelulares, o a la menor actividad de las proteasas intracelulares. Otra característica que se debe resaltar es la capacidad de

mantenimiento de la actividad proteolítica durante varias horas, porque después de 9 días de incubación la enzima sigue activa.

3.4.2. PRUEBA PROTEOLITICA EN CASEÍNA

La actividad semicuantitativa de las proteasas intracelulares que se encuentran en el extracto intracelular, se evaluó en placas conteniendo sustrato caseína. Los resultados se evaluaron en diferentes tiempos de incubación, a los 2, 3, 4, 5 y 6 días. Se siguió el apartado 2.3.8. de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la tabla 13:

Tabla 13

Actividad semicuantitativa de proteasas intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en medio con sustrato caseína.

| Cepa | Presencia de halo | Halo (mm) | | | | |
|----------|-------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | | 2° día | 3° día | 4° día | 5° día | 6° día |
| M3H1027 | + | - | - | - | - | 1.55 |
| ML106512 | + | - | - | - | 1.3 | 2.01 |
| M4H153D | + | 0.73 | 1.25 | 1.88 | 2.02 | 2.76 |

+ = actividad proteolítica presente; - = ausencia de la actividad proteolítica

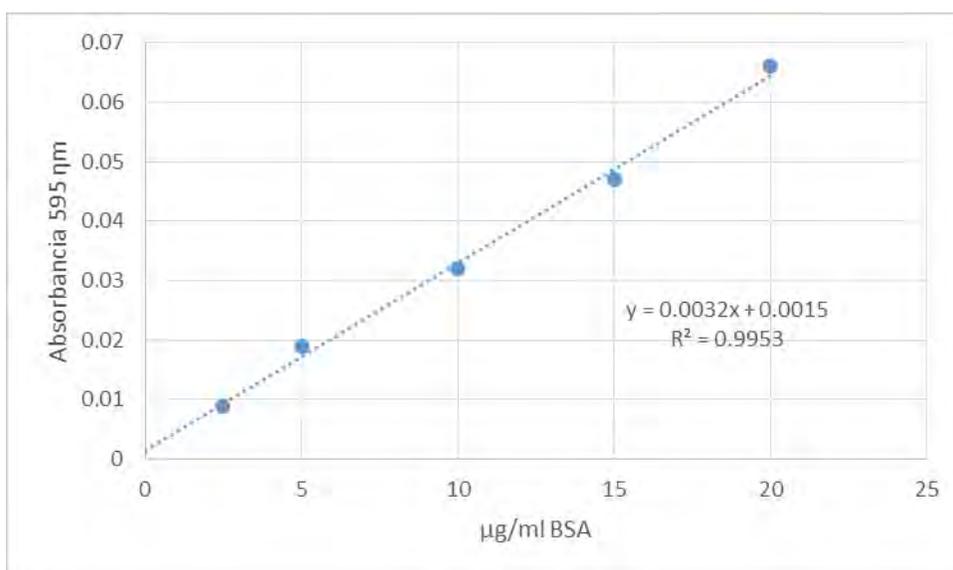
Las cepas M3H1027 y ML106512 no mostraron halos de hidrólisis hasta el 5° y 6° día a comparación de la cepa M4H153D que mostró actividad proteínica desde el segundo día de incubación y cuyo halo alcanza 2.76 milímetros luego de 6 días de incubación, mientras que las cepas M3H1027 y ML106512 mostraron halos de 1.55 mm y 2.01 mm respectivamente. Estos resultados podrían estar relacionados a la mayor producción de proteasas intracelulares de la cepa M4H153D y al mantenimiento de la actividad por largos tiempos, lo cual indica que tienen una vida media amplia. Así mismo con este experimento se confirma la capacidad de producción de proteasas intracelulares de las cepas en estudio.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Esta prueba tiene como objetivo cuantificar la concentración de proteínas de los extractos extracelulares e intracelulares, se siguió el método de Bradford descrita en la Metodología. Para la cuantificación fue necesario realizar la curva estándar (Figura 1), utilizando BSA como proteína patrón de concentración conocida. Para poder determinar la concentración exacta utilizada en la actividad semicuantitativa extracelular e intracelular se evaluaron las concentraciones de proteínas.

Figura 1

Curva estándar de BSA para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford



Los datos para construir la curva se encuentran en la Tabla 14:

Tabla 14

Curva de calibración utilizando una solución de BSA a 100 µg/ml.

| Tubo N° | BSA (µg/ml) | Absorbancia de la muestra | Absorbancia del blanco | Abs muestra– abs blanco |
|---------|----------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0 | 0 | 0.398 | 0.398 | 0.000 |
| 1 | 1.25 | 0.407 | 0.398 | 0.009 |
| 2 | 2.5 | 0.417 | 0.398 | 0.019 |
| 3 | 5 | 0.430 | 0.398 | 0.032 |
| 4 | 7.5 | 0.445 | 0.398 | 0.047 |
| 5 | 10 | 0.464 | 0.398 | 0.066 |

Para obtener la cuantificación de los extractos extracelulares e intracelulares en µg /ml se analizan 50 y 100 µl de las muestras M3H1027, ML106512 y M4H153D. Seguidamente se realizó las lecturas al espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda, se obtuvo las absorbancias y se restó la absorbancia del blanco que es la absorbancia obtenida del reactivo de Bradford sin proteínas. Luego, se reemplazó en la ecuación de la recta de la curva estándar y finalmente se multiplicó por el factor de volumen de muestra utilizada (Tabla 15):

Tabla 15

Concentración de proteínas de los extractos obtenidos de las cepas M3H1027, ML106512 y M3H153D.

| | Código de la muestra | Muestra (μl) | Absorbancia muestra (ηm) | Abs de la muestra - abs del blanco (ηm) | μg/ml | Factor de corrección (μg/ml) | Promedio (μg/ml) |
|--------------|----------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------|------------------------------|------------------|
| EXTRACELULAR | M3H1027 | 50 | 0.413 | 0.015 | 4.22 | 42.19 | 44.93 |
| | | 100 | 0.430 | 0.032 | 9.53 | 47.66 | |
| | ML106512 | 50 | 0.411 | 0.013 | 3.59 | 35.94 | 27.74 |
| | | 100 | 0.412 | 0.014 | 3.91 | 19.53 | |
| | M4H153D | 50 | 0.428 | 0.03 | 8.91 | 89.06 | 69.92 |
| | | 100 | 0.432 | 0.034 | 10.16 | 50.78 | |
| INTRACELULAR | M3H1027 | 50 | 0.446 | 0.048 | 14.53 | 145.31 | 142.58 |
| | | 100 | 0.489 | 0.091 | 27.97 | 139.84 | |
| | ML106512 | 50 | 0.461 | 0.063 | 19.22 | 192.19 | 176.96 |
| | | 100 | 0.503 | 0.105 | 32.34 | 161.72 | |
| | M4H153D | 50 | 0.502 | 0.104 | 32.03 | 320.31 | 246.49 |
| | | 100 | 0.510 | 0.112 | 34.53 | 172.66 | |

Según los resultados obtenidos en la tabla 15 la concentración de proteínas obtenidas de los extractos extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D resultó ser menor frente a la concentración de proteínas obtenidas de extractos intracelulares. Estos extractos extracelulares cuentan con una menor cantidad de proteínas.

3.6. ACTIVIDAD PROTEASA DE LOS EXTRACTOS EXTRACELULARES E INTRACELULARES EN FUNCION A LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

Para determinar la actividad semicuantitativa de los extractos extracelulares e intracelulares se expresó la actividad como diámetro del halo expresado en mm por cantidad de proteínas expresado en microgramos, los resultados se muestran en las Tablas 16 y 17. Las evaluaciones tanto con extractos extracelulares como con extractos intracelulares se

realizaron con 100 μ l, en base a este volumen se realizó el cálculo de la proteína total expresado en microgramos.

Tabla 16

Actividad proteasa de extractos extracelulares e intracelulares (mm/ μ g de proteína) en sustrato gelatina.

| | Cepa | Concentración de proteínas (μ g/ml) | Diámetro del halo de hidrólisis (mm) | Cantidad de proteínas en 100 μ l (μ g) | Actividad proteasa (mm/ μ g) |
|--------------|----------|------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|
| EXTRACELULAR | M3H1027 | 44.93 | 6.32 | 4.493 | 1.41 |
| | ML106512 | 27.74 | 8.41 | 2.774 | 3.03 |
| | M4H153D | 69.92 | 15.87 | 6.692 | 2.37 |
| INTRACELULAR | M3H1027 | 142.58 | 1.37 | 14.258 | 0.10 |
| | ML106512 | 176.96 | 3.03 | 17.696 | 0.17 |
| | M4H153D | 246.49 | 4.81 | 24.649 | 0.20 |

Tabla 17

Actividad proteasa de extractos extracelulares e intracelulares (mm/μg de proteína) en sustrato caseína.

| | Cepa | Concentración de proteínas (μg/ml) | Diámetro del halo de hidrólisis (mm) | Cantidad de proteínas en 100 μl (μg) | Actividad proteasa (mm/μg) |
|--------------|----------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| EXTRACELULAR | M3H1027 | 44.93 | 2.48 | 4.493 | 0.55 |
| | ML106512 | 27.74 | 4.55 | 2.774 | 1.64 |
| | M4H153D | 69.92 | 2.59 | 6.692 | 0.39 |
| INTRACELULAR | M3H1027 | 142.58 | 1.55 | 14.258 | 0.11 |
| | ML106512 | 176.96 | 2.01 | 17.696 | 0.11 |
| | M4H153D | 246.49 | 2.76 | 24.649 | 0.11 |

En cuanto a la actividad proteasa de los extractos extracelulares (mm/μg) en sustrato gelatina obtenidos de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D son 1.41 mm/μg, 3.03 mm/μg y 2.37 mm/μg, respectivamente, se observa que tales extractos extracelulares tienen mayor actividad que los extractos intracelulares, estas últimas para las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D son 0.1 mm/ug, 0.17 mm/ug y 0.2 mm/ug respectivamente. Este mismo resultado se obtiene para la actividad proteasa de extractos extracelulares en sustrato caseína, siendo de 0.55 mm/μg para la cepa M3H1027, 1.64 mm/μg para la cepa ML1065112 y 0.39 mm/μg para la cepa M4H153D, las mismas que son mayores que las actividades intracelulares que es 0.11 mm/ug para las tres cepas en estudio.

Se evidencia una diferencia en la concentración de proteínas, los extractos extracelulares tienen menor concentración de proteínas en comparación con los extractos intracelulares (Tabla 15). En cuanto a la actividad enzimática, depende de varias condiciones en el método de cultivo, estudios indican que la producción de proteasas extracelulares se ve afectada por el tiempo de incubación en el medio de cultivo, y los componentes del medio, por lo que los resultados del presente trabajo sugieren que el sustrato gelatina podría estar más accesible al centro activo de las proteasas presentes en los extractos extracelulares, mientras que las

actividades de proteasas intracelulares son menores, lo cual indica la discriminación a nivel de sustrato que tienen las proteasas de las cepas en estudio.

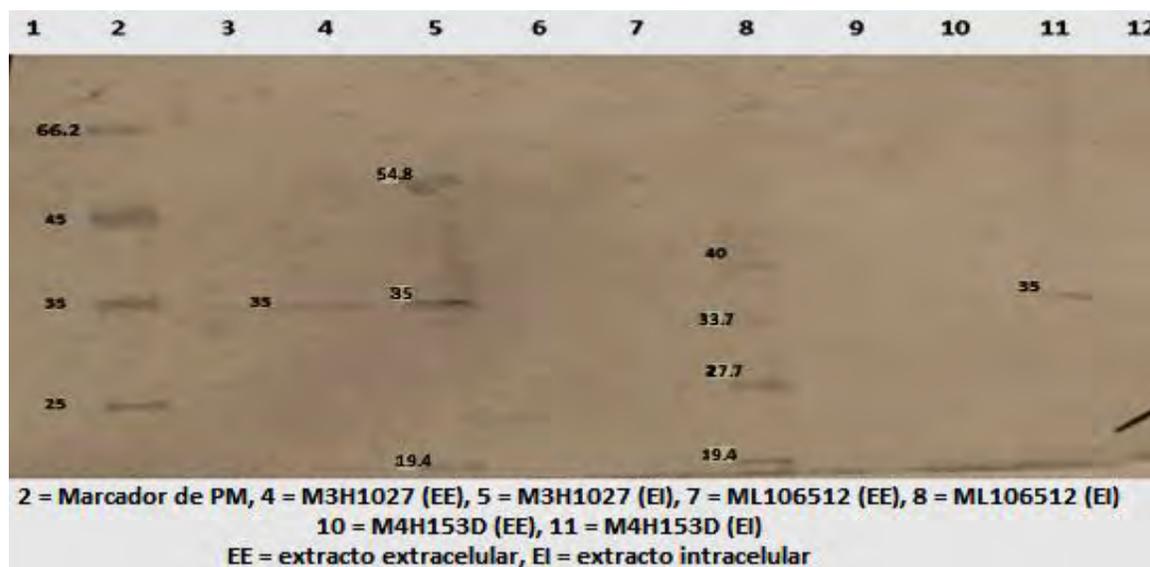
3.7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes para determinar el peso molecular de las proteínas extracelulares e intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

La figura 2 muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los extractos extracelulares e intracelulares de las proteínas de las cepas en estudio. Para determinar los pesos moleculares de las proteínas incógnitas se utilizó el marcador SDS-PAGE Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific),

Figura 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los extractos extracelulares e intracelulares de las proteínas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Aquellos carriles del gel que no indica su contenido, significa que están vacíos.



Para la determinación de la movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas del marcador de peso molecular conocido se halló dividiendo la distancia recorrida de la banda de interés entre la distancia total recorrida, como se muestra en la Tabla 18:

Tabla 18

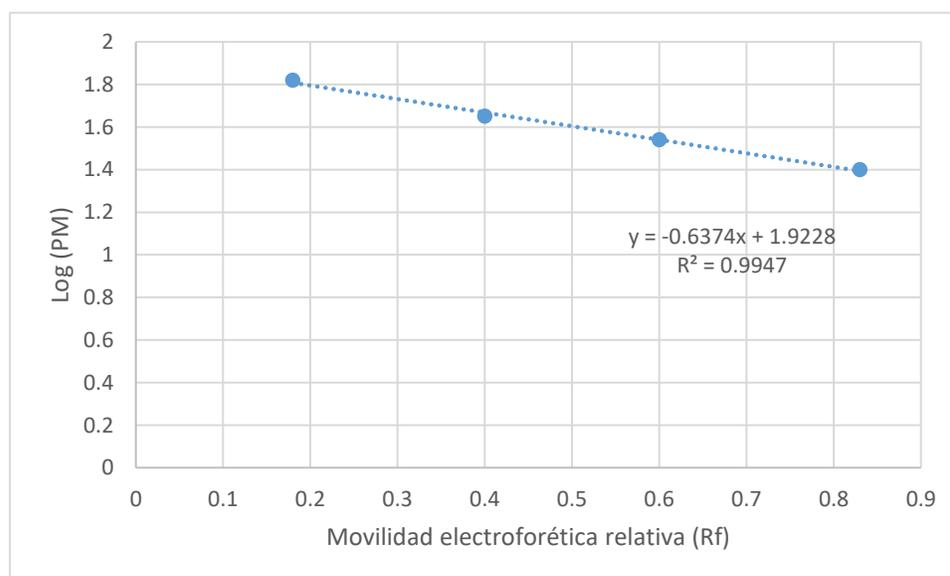
Determinación de la movilidad electroforética relativa de las bandas del marcador de peso molecular conocido

| Bandas visibles en el marcador | Distancia recorrida (cm) | Distancia total (cm) | Rf | PM (kDa) | Log (pm) |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|------|----------|----------|
| 1 | 1.1 | 6 | 0.18 | 66.2 | 1.82 |
| 2 | 2.4 | 6 | 0.40 | 45 | 1.65 |
| 3 | 3.6 | 6 | 0.60 | 35 | 1.54 |
| 4 | 5.0 | 6 | 0.83 | 25 | 1.4 |

Se realizó una curva de calibración para observar una relación entre el log PM y la movilidad electroforética relativa (Rf) (Figura 3)

Figura 3

Curva de calibración para hallar el peso molecular de proteínas incógnitas



Para determinar los pesos moleculares de las bandas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se interpoló y extrapoló los valores de sus movilidades electroforéticas relativas (Rf) al comparar con el marcador de peso molecular (Figura 4)

Figura 4

Peso molecular versus movilidad electroforética relativa para la determinación del PM de las bandas de proteínas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D

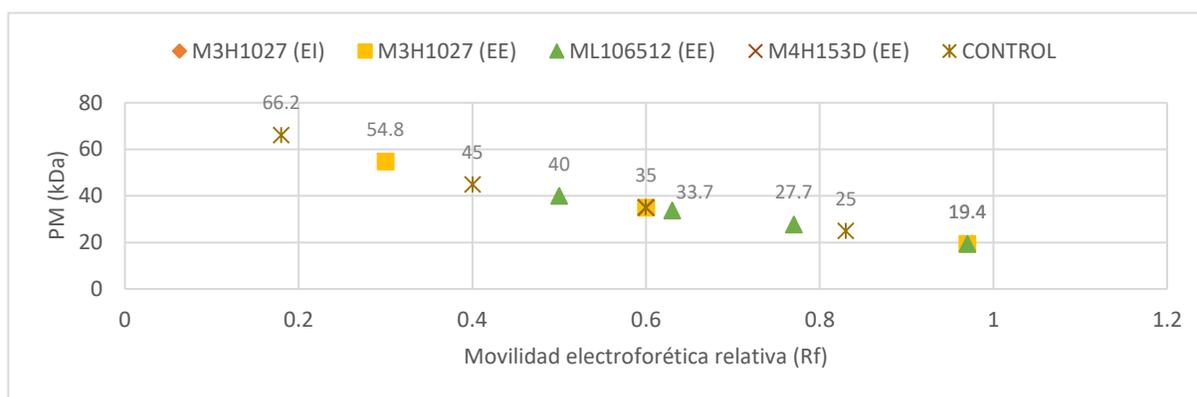


Tabla 19

Movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas de los extractos extracelulares e intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

| Cepa | Banda | Distancia recorrida (cm) | Distancia total (cm) | Rf | PM (kDa) | Log(pm) |
|--------------|-------|--------------------------|----------------------|------|----------|---------|
| M3H1027 (EI) | 1 | 3.6 | 6 | 0.6 | 35 | 1.54 |
| M3H1027(EE) | 2 | 1.8 | 6 | 0.3 | 54.8 | 1.74 |
| | 3 | 3.6 | 6 | 0.6 | 35 | 1.54 |
| | 4 | 5.8 | 6 | 0.97 | 19.4 | 1.29 |
| | 5 | 3 | 6 | 0.5 | 40 | 1.60 |
| ML106512(EE) | 6 | 3.8 | 6 | 0.63 | 33.7 | 1.53 |
| | 7 | 4.6 | 6 | 0.77 | 27.7 | 1.44 |
| | 8 | 5.8 | 6 | 0.97 | 19.4 | 1.29 |
| M4H153D (EE) | 9 | 3.6 | 6 | 0.6 | 35 | 1.54 |

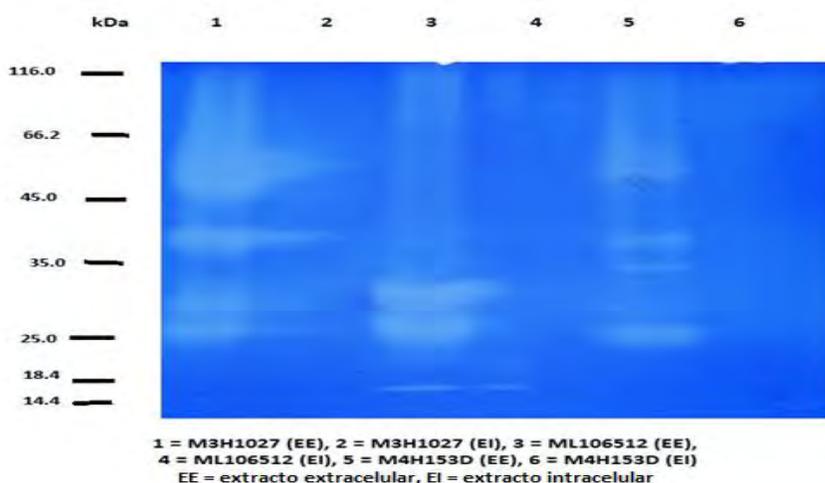
La tabla 19 muestra los pesos moleculares de las bandas de los extractos extracelulares e intracelulares de las cepas en M3H1027, ML106512 y M4H153D, siendo la banda de 35 kDa correspondiente al extracto intracelular de la cepa M3H1027; las bandas de 54.8 kDa, 35 kDa y 19.4 kDa correspondiente al extracto extracelular de la cepa M3H1027; las bandas de 40 kDa, 33.7 kDa, 27.7 kDa y 19.4 kDa pertenecen al extracto extracelular de la cepa ML106512; y por último la banda de 35 kDa correspondiente al extracto extracelular de la cepa M4H153D. Como se puede observar en la figura 2 y en la tabla 19 son pocas las proteínas que son visibles, esto puede ser debido a la baja concentración en la que se encuentran en la muestra o a la relativa poca sensibilidad de la coloración con azul de Coomasie.

3.8. ZIMOGRAMA COPOLIMERIZADO CON GELATINA

La actividad proteolítica en geles de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (0.1%), que actúa como sustrato, se realizó para averiguar cuál de las bandas proteicas reveladas en la SDS-PAGE correspondía a una proteasa. En la figura 5 se muestra el resultado de este ensayo, en el gel se cargan los mismos extractos extracelulares e intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Se visualizan bandas de proteína o zonas claras como señal de digestión del sustrato gelatina, esto revela la existencia de la actividad enzimática, y más aún que se visualice las bandas de actividad de proteasas de proteínas que no son visibles a la coloración de azul de coomassie, lo cual indica su alta actividad enzimática.

Figura 5

Zimograma en presencia de gelatina al 0.1% de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.



Para la determinación de la movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas del marcador de peso molecular conocido se halló dividiendo la distancia recorrida por la banda de interés entre la distancia total recorrida, como se muestra en la Tabla 20:

Tabla 20

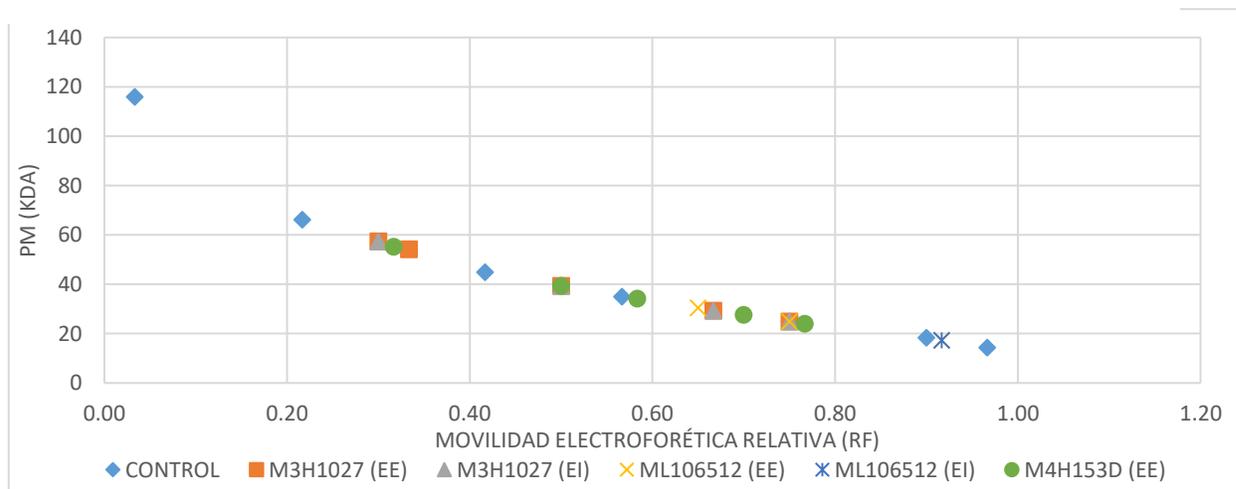
Determinación de la movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas de proteínas del marcador de peso molecular conocido.

| Marcador | Distancia recorrida (cm) | Distancia total (cm) | Rf | PM (kDa) | Log (PM) |
|----------|--------------------------|----------------------|------|----------|----------|
| 1 | 0.2 | 6 | 0.03 | 116.0 | 2.06 |
| 2 | 1.3 | 6 | 0.22 | 66.2 | 1.82 |
| 3 | 2.5 | 6 | 0.42 | 45 | 1.65 |
| 4 | 3.4 | 6 | 0.57 | 35 | 1.54 |
| 5 | 4.5 | 6 | 0.75 | 25 | 1.4 |
| 6 | 5.4 | 6 | 0.9 | 18.4 | 1.26 |
| 7 | 5.8 | 6 | 0.97 | 14.4 | 1.16 |

Se realizó una curva de calibración para observar una relación entre el log PM y la movilidad electroforética relativa (Rf).

Figura 6

Peso molecular versus movilidad electroforética relativa para la determinación del PM de las proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D



Para determinar los pesos moleculares de las bandas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se interpoló y extrapolo los valores de sus movilidades electroforéticas relativas (Rf) al comparar con el marcador de peso molecular Para determinar los pesos moleculares de las bandas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D (Figura 6)

La Tabla 21 muestra los pesos moleculares de las bandas de los extractos extracelulares e intracelulares de las cepas en estudio que se han observado en el gel de zimograma de la figura 5.

Tabla 21

Determinación del peso molecular de las proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D

| Cepa | Banda | Distancia recorrida (cm) | Distancia total (cm) | Rf | PM (kDa) | Log (pm) |
|---------------|-------|--------------------------|----------------------|------|----------|----------|
| M3H1027 (EE) | 1 | 1.8 | 6 | 0.30 | 57.4 | 1.76 |
| | 2 | 2.0 | 6 | 0.33 | 54.2 | 1.73 |
| | 3 | 3.0 | 6 | 0.5 | 39.4 | 1.60 |
| | 4 | 4.0 | 6 | 0.67 | 29.4 | 1.47 |
| | 5 | 4.5 | 6 | 0.75 | 25 | 1.40 |
| M3H1027 (EI) | 6 | 1.8 | 6 | 0.3 | 57.4 | 1.76 |
| | 7 | 3.0 | 6 | 0.5 | 39.4 | 1.60 |
| | 8 | 4.0 | 6 | 0.67 | 29.4 | 1.47 |
| | 9 | 4.5 | 6 | 0.75 | 25 | 1.40 |
| ML106512 (EE) | 10 | 3.9 | 6 | 0.65 | 30.5 | 1.48 |
| | 11 | 4.5 | 6 | 0.75 | 25 | 1.40 |
| | 12 | 5.5 | 6 | 0.92 | 17.3 | 1.24 |
| ML106512 (EI) | 13 | 5.5 | 6 | 0.92 | 17.3 | 1.24 |
| M4H153D (EE) | 14 | 1.9 | 6 | 0.32 | 55.2 | 1.74 |
| | 15 | 3.0 | 6 | 0.50 | 39.4 | 1.60 |
| | 16 | 3.5 | 6 | 0.58 | 34.3 | 1.54 |
| | 17 | 4.2 | 6 | 0.7 | 27.7 | 1.44 |
| | 18 | 4.6 | 6 | 0.77 | 24.1 | 1.38 |

Según los resultados de la Tabla 21, se puede realizar alguna correlación entre las bandas de proteínas que se visualizan en el gel SDS-PAGE y las bandas de actividad de proteasas que se visualizan en el zimograma, así en la cepa M3H1027 (EE) se observan 3 bandas de proteínas y en el zimograma se observan 5 bandas con actividad de proteasas, de las cuales las proteínas de aproximadamente 54.2 kDa y 39.4 kDa están presentes en ambos geles. En los extractos de la cepa M3H1027 (EI) son cuatro bandas con actividad de proteasas, pero en el gel SDS-PAGE únicamente se observa una banda proteica de aproximadamente 35 kDa. En cuanto a los extractos extracelulares de la cepa ML106512 (EE) son cuatro las proteínas visibles en SDS-PAGE mientras que el zimograma se presentan 3 y las tres se correlacionan con las bandas presentes en el gel SDS-PAGE de aproximadamente 30.5 kDa, 25 kDa y 17.3 kDa. Cabe indicar que los pesos moleculares son aproximados a pesar de los esfuerzos de realizar la mayor aproximación posible. El extracto intracelular de la cepa ML106512 (EI) no presenta bandas de proteínas en el gel SDS-PAGE, mientras que en el zimograma hay una proteína de 17.3 kDa con actividad de proteasas. Los extractos extracelulares de la cepa M4H153D (EE) tiene una proteína mayoritaria de 35 kDa que podría tratarse de la enzima de 34.3 kDa que se observa en el zimograma cuya actividad está presente conjuntamente con otras 4 bandas con actividad enzimática; en este caso en particular las cuatro enzimas proteasas que se observan en el zimograma se trata de proteínas que se encuentran en baja concentración, pero con alta actividad de proteasas. Finalmente, el extracto intracelular de la cepa M4H153D (EI) no presenta ninguna banda tanto en el gel SDS-PAGE y en el zimograma. Este último extracto revela actividad de proteasa cuando se evalúa en placa de cultivo, la explicación de esta actividad podríamos dirigirla a la presencia de sales del medio de cultivo, y es posible que estas sales actúen como activadores enzimáticos, los cuales serían entonces responsables de la actividad de proteasas visibles.

3.9. MÉTODO DE INHIBICIÓN EN ZIMOGRAMA

Para identificar las proteasas de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se evaluó la inhibición en zimograma utilizando gelatina como sustrato. Se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos 2.3.12.

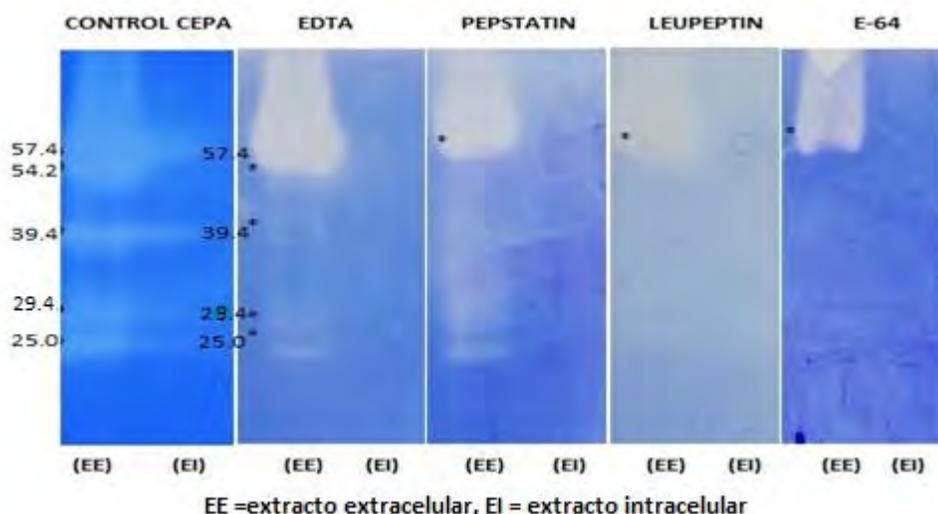
Se utilizó el marcador de peso molecular (Thermo scientific) y como inhibidores al EDTA, pepstatín, leupeptín y E-64.

En la cepa **M3H1027**, con el inhibidor EDTA, ninguna banda con actividad de proteasa es inhibida por lo tanto ninguna es una metaloproteasa. Por otro lado, las proteasas de alto peso molecular (57.4 kDa) revela alta actividad proteolítica que no es inhibida por ninguno de los cuatro inhibidores utilizados. Con el inhibidor pepstatín ninguna banda de las bandas de proteasas es inhibida, por lo que ninguna sería aspártico proteasa. Cuando las proteasas se enfrentan al inhibidor leupeptín las proteasas de peso molecular 25, 29.4, 39.4 y 54.2 kDa se inhiben por lo tanto serían serín proteasas; finalmente con el inhibidor E-64 las proteasas de peso molecular 25, 29.4, 39.4 y 54.2 kDa se inhiben por lo tanto son cisteínas proteasas (Figura 7).

Se determina entonces que las proteasas de peso molecular 54.2, 39.4, 29.4 y 25 kDa son serín - cisteín proteasas; y la proteasa de más alto peso molecular (57.4 kDa) no pierde actividad, esta es una enzima que no se inhibe con ninguno de los 4 por lo que tendría otro inhibidor. En el caso de las enzimas del extracto intracelular no se puede concluir ya que es posible que las enzimas que deberían mostrar actividad necesiten más tiempo para ser

Figura 7

Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa M3H1027.



evidente.

En 2012, Xin *et al.*, aisló un halófilo de la cepa LY20 de *Salimicrobium halophilum* que produce amilasa y proteasa extracelular, la proteasa mostró una inhibición completa, lo que indica que probablemente pertenecía a la subclase de las serinas proteasas con residuos de

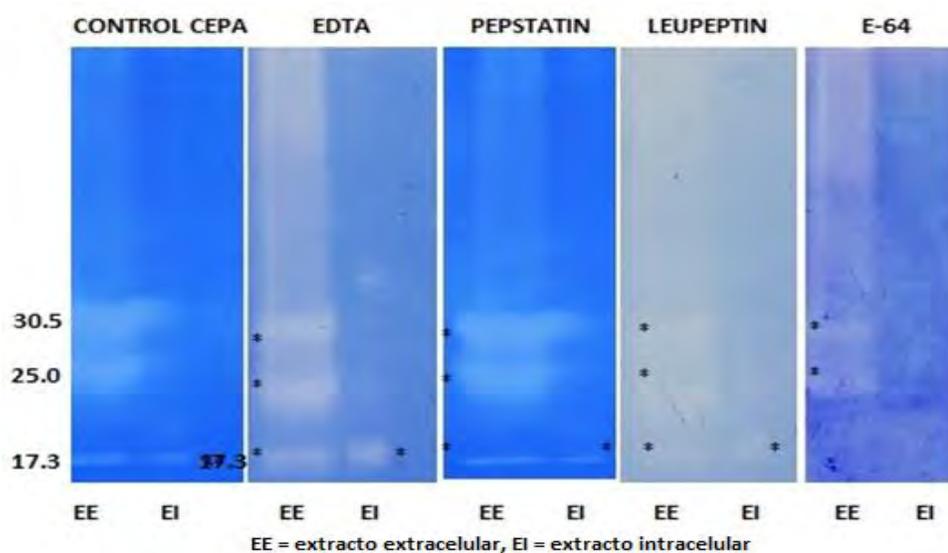
cisteína e histidina. Por otro lado, *Staphylococcus aureus* produce varias proteasas proteasas extracelulares incluidas serinas, cisteínas y metalo enzimas (Dubin, 2002).

Karbalaei *et al.*, en 2009 purificaron una proteasa extracelular de 36 kDa de *Halobacillus karajensis* cepa MA-2 sensible a la inhibición de PMSF y EDTA lo que indica que probablemente pertenece a la subclase de serín metaloproteasa.

En la cepa **ML106512** (Figura 8), las proteasas extracelulares de 30.5 y 25 kDa no se inhiben con EDTA, pepstatín, leupeptín y E-64, se tratan de proteasas que deben responder a otro inhibidor. Por otro lado, la proteasa de 17.3 kDa es inhibida con E-64 por lo que se identifica como cisteín proteasa tanto en el extracto extracelular como intracelular.

Figura 8

Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa ML106512

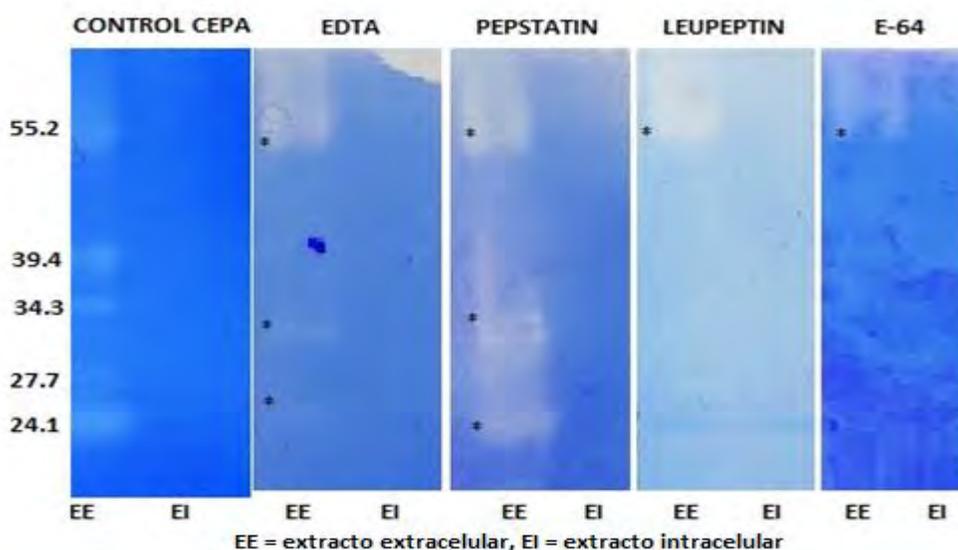


En la cepa **M4H153D** (Figura 9), con el inhibidor EDTA se observó una banda de 32 kDa aproximadamente, tamaño que previamente no fue observada en los zimogramas; la presencia de esa enzima podría ser la pérdida de una subunidad de una proteasa de mayor tamaño, es decir podría corresponder a las proteasas de 55.2, 39.4 y 34.3 kDa; hecho que debería ser comprobado. Las proteasas 39.4, 34.3 y 24.1 kDa son metaloproteasas porque son inhibidas por EDTA. Con el inhibidor pepstatín también se observó la presencia de enzimas que perdieron alguna subunidad (señaladas con asterisco en la figura 9). Finalmente,

los inhibidores leupeptín y E-64 inhiben a todas las proteasas pequeñas (39.4, 34.3, 27.7 y 24.1 kDa) por lo tanto son serín – cisteín proteasas tal como ocurre con la cepa M3H1027. La proteasa de alto peso molecular de 55.2 kDa no es inhibida por ninguno de los 4 inhibidores utilizados.

Figura 9

Inhibición de la proteasa perteneciente a la cepa M4H153D



3.10. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D se realizó un zimograma copolimerizado con sustrato gelatina. Este efecto fue investigado usando diferentes temperaturas en un rango que va desde 4°C hasta 80°C. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10 - 17.

Figura 10

Evaluación de la actividad proteolítica a 4°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

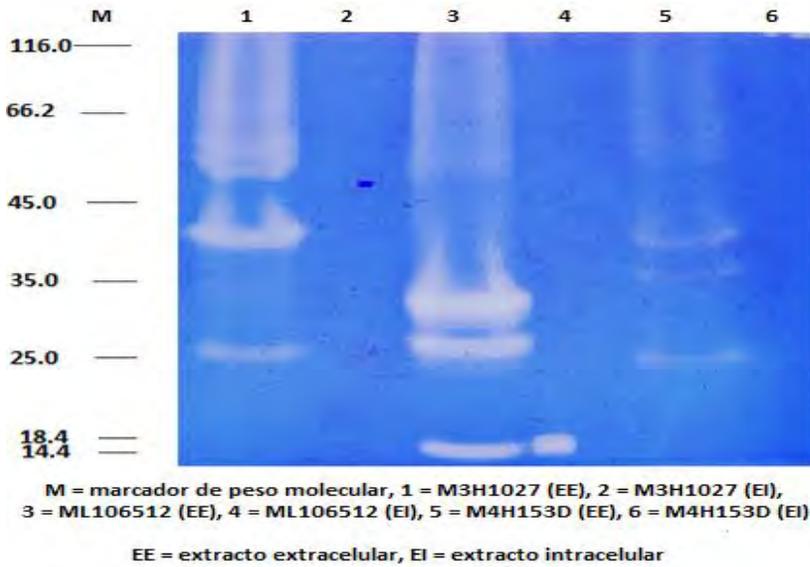


Figura 11

Evaluación de la actividad proteolítica a 20°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

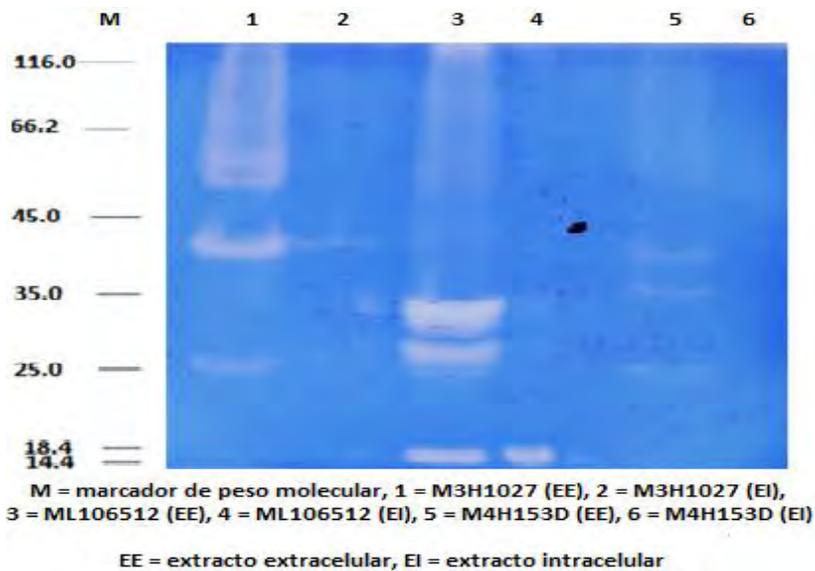


Figura 12

Evaluación de la actividad proteolítica a 30°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

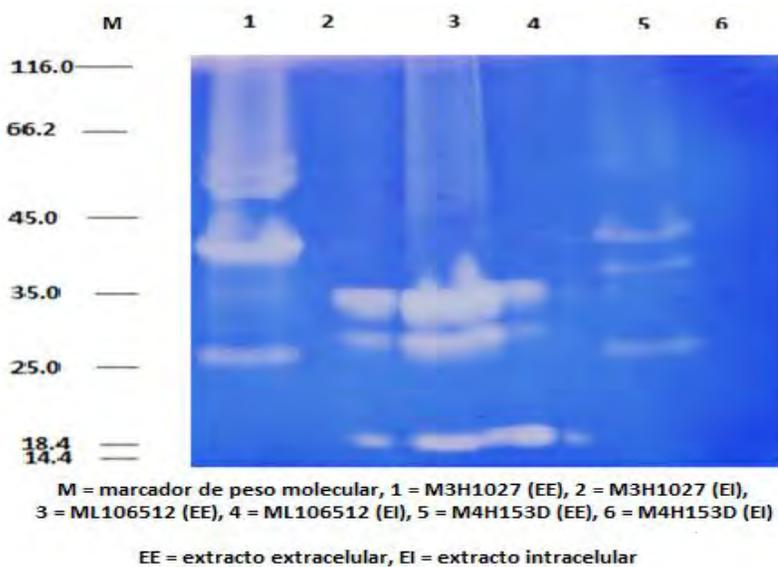


Figura 13

Evaluación de la actividad proteolítica a 40°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

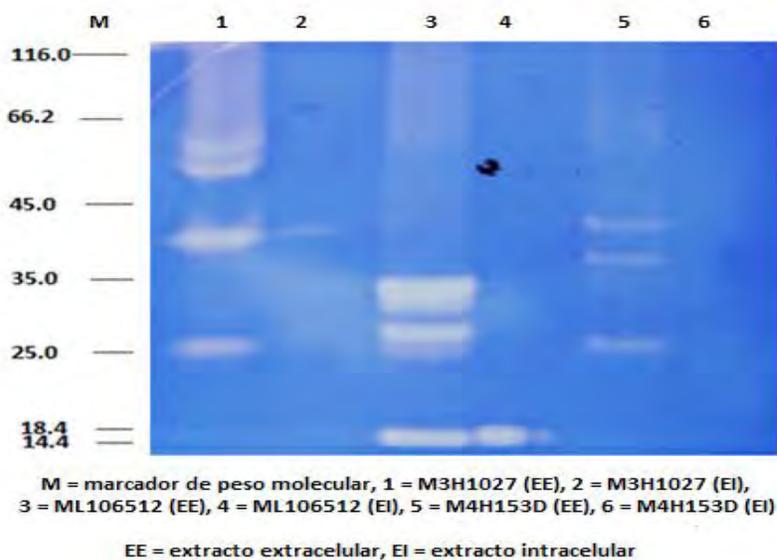


Figura 14

Evaluación de la actividad proteolítica a 50°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

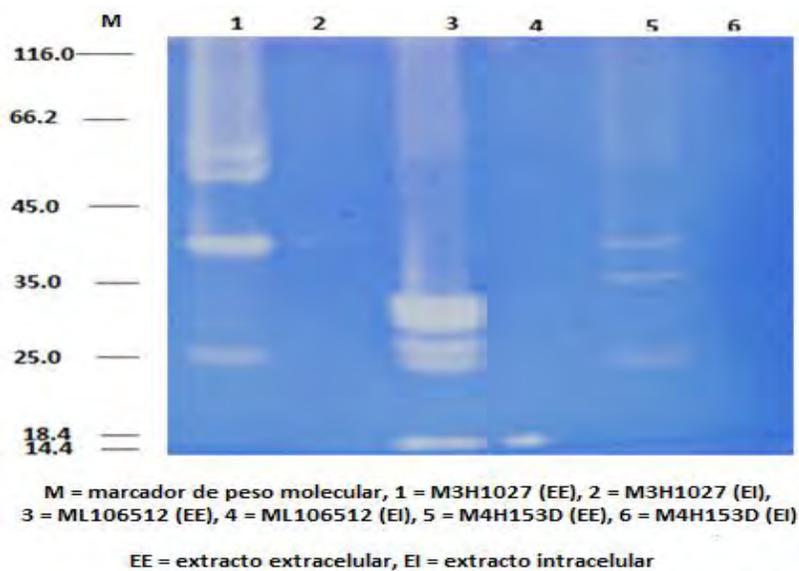


Figura 15

Evaluación de la actividad proteolítica a 60°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

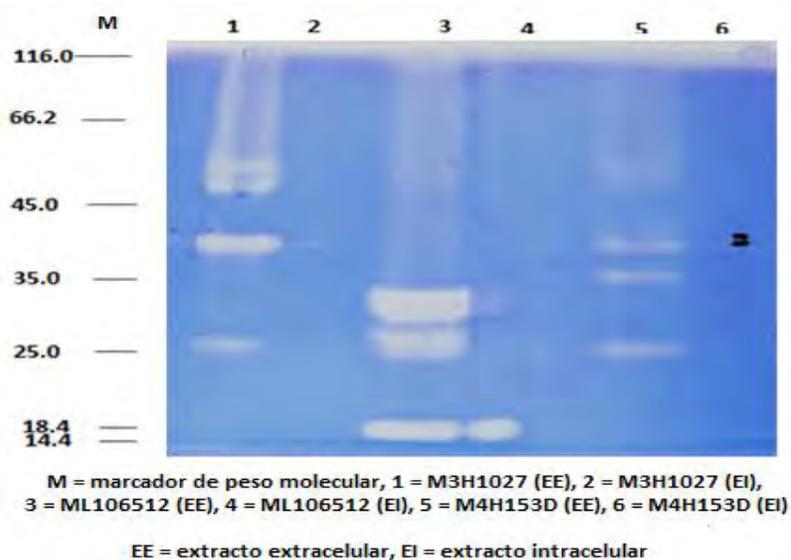


Figura 16

Evaluación de la actividad proteolítica a 70°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

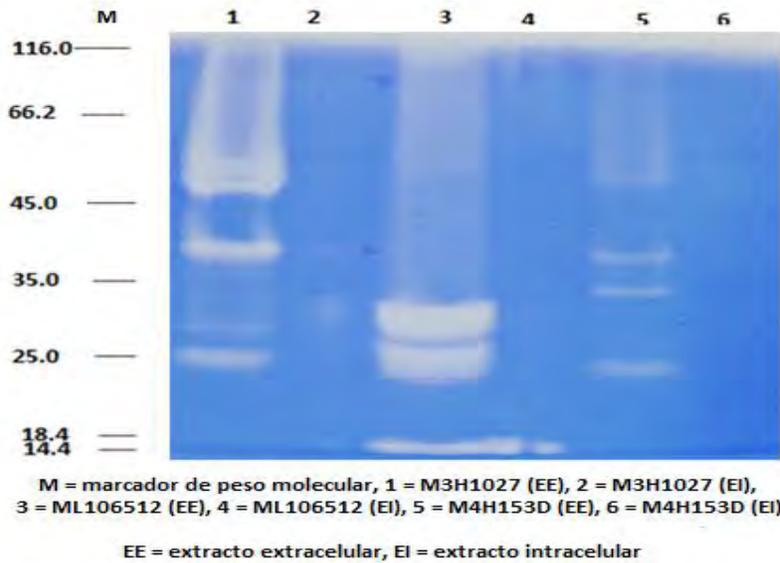
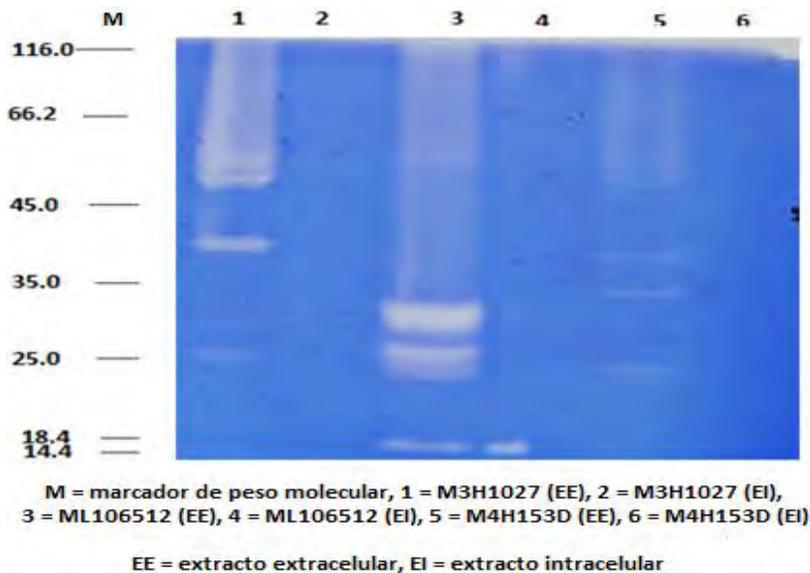


Figura 17

Evaluación de la actividad proteolítica a 80°C de extractos extracelulares (EE) e intracelulares (EI) de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.



Se probó el efecto de la temperatura en un rango de 4°C - 80°C sobre la actividad de las proteasas con gelatina como sustrato. En las Tablas 22 - 24 se enumeran las proteasas (kDa) obtenidas de los extractos extracelulares e intracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. No puede determinar la temperatura óptima, pero si un rango de temperatura a la cual muestra su mayor o mejor actividad. La evaluación de la actividad cualitativa (%) se realiza utilizando un sistema de cruces (+), asignando 4 cruces a la actividad con señal más intensa (100 %), 3 cruces al 75 % de la actividad, 2 cruces al 50 % de la actividad, hasta 1 cruz para identificar la actividad minoritaria o poca señal (25%). En la tabla 22 se muestra el efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa **M3H1027**.

Tabla 22

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027

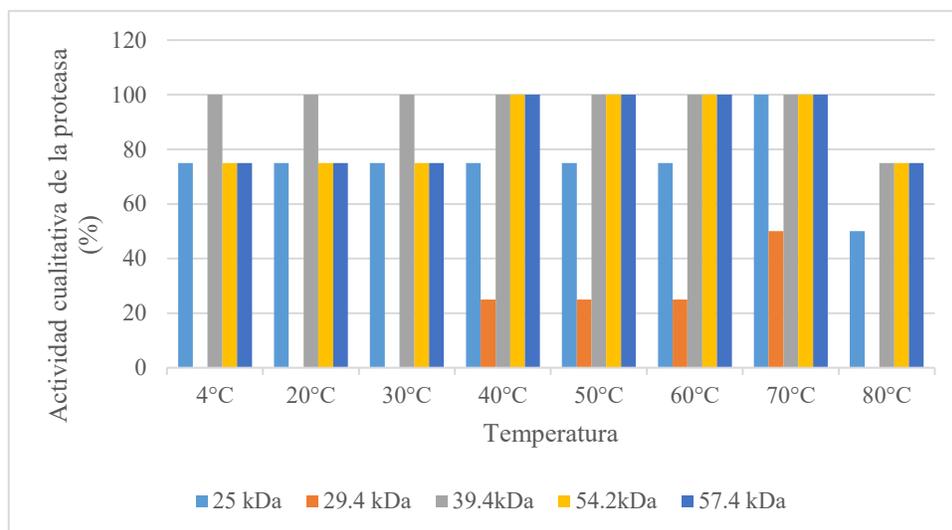
| PM proteasas (kDa) | Efecto de la temperatura | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 4°C | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C | 70°C | 80°C |
| 57.4 | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 54.2 | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 39.4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 29.4 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | +++ | - |
| 25.0 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Para una mejor visualización de los rangos de temperatura a la cual hay más actividad, se realiza un gráfico (Figura 18) en base a los resultados de la tabla 22.

Figura 18

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027



Las proteasas de peso molecular 57.4, 54.2 kDa tienen una mejor actividad entre 40°C y 70°C. La actividad de la proteasa de 39.4 kDa es amplia entre 4 - 70°C y disminuye en 80°C. mostraron un rango de temperatura amplio entre 40 - 70°C y disminuye en 80°C. La proteasa de 29.4 kDa en un rango de 4 - 30°C y 80°C no muestra actividad, desde 40 - 70°C muestra un rango de temperatura amplio, siendo la mayor actividad a 70°C. Finalmente la actividad de la proteasa de 25 kDa se mantiene desde 4 - 70°C, siendo a 70°C la mayor actividad, pero disminuye a 80°C.

Tabla 23

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa ML106512

| Proteasas | PM (kDa) | Efecto de la temperatura | | | | | | | |
|----------------|----------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 4°C | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C | 70°C | 80°C |
| EXTRACELULARES | 30.5 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| | 25 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| | 17.3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| INTRACELULARES | 17.3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50%, +++ = 75%, ++++ = 100%

Estos resultados se muestran ilustrados en las figuras 19 y 20 que se muestran a continuación:

Figura 19

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa

ML106512

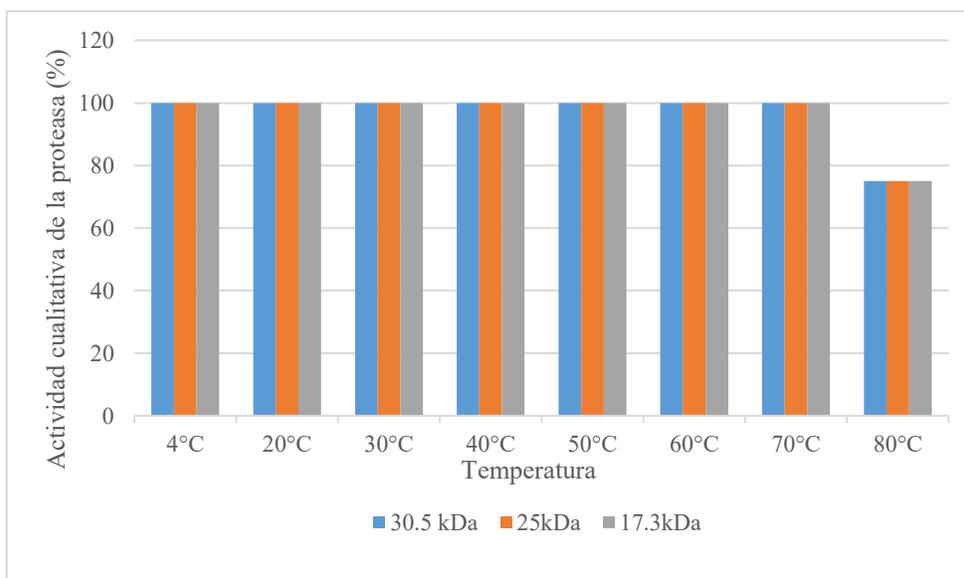
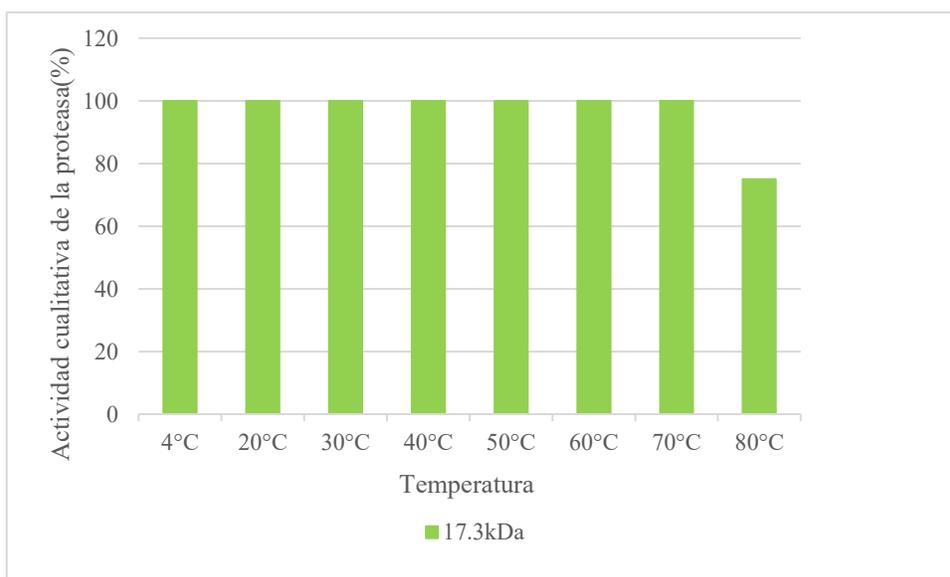


Figura 20

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa

ML106512



El efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa **ML106512** se muestra en la Tabla 23, las proteasas extracelulares de 30.5, 25 y 17.3 kDa y la proteasa intracelular de 17.3 kDa mantienen su actividad en un amplio rango de temperatura desde 4°C hasta 70°C, y revela al 100% la actividad cualitativa con una señal más intensa y empieza a disminuir al 75 % a 80°C.

Tabla 24

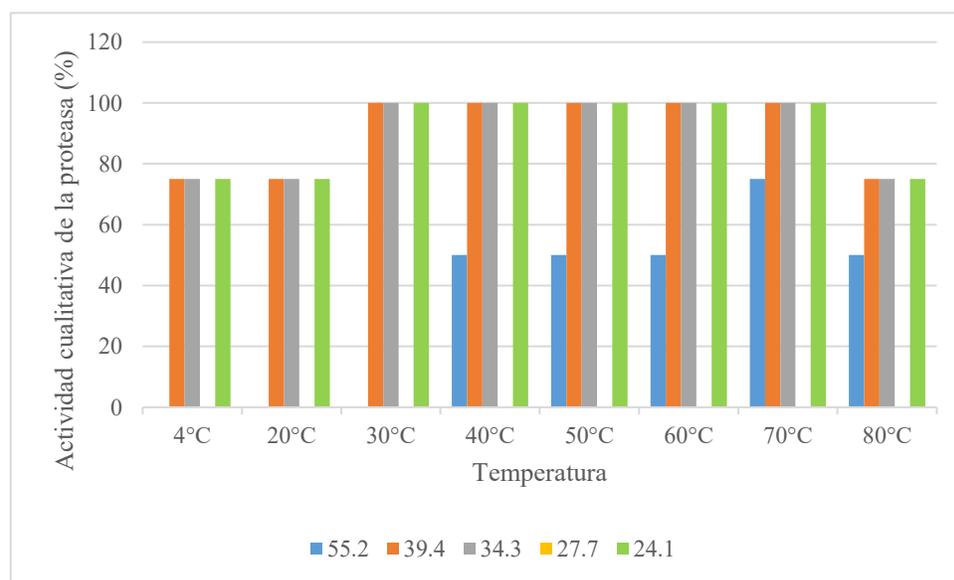
Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D

| PM proteasas (kDa) | Efecto de temperatura | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 4°C | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C | 70°C | 80°C |
| 55.2 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 39.4 | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 34.3 | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 27.7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24.1 | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Figura 21

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D



La Tabla 24 muestra el efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la cepa **M4H153D**. La proteasa de 55.2 kDa no muestra actividad entre 4 - 30°C, mientras que entre 40 - 70°C mantuvieron su actividad proteolítica al 50%, aumentando al 75 % una mayor temperatura a 70°C, finalmente a 80°C decrece significativamente en un 50 %. Las proteasas de 39.4, 34.3 y 24.1 kDa alcanzan un rango de temperatura óptima en un 100% entre 30 - 70°C. La proteasa de 27.7 kDa no muestra ninguna actividad en los ensayos de diferente temperatura ya que es una proteasa lábil. En la figura 21 se muestra una mejor visualización en base a los resultados de la tabla 24.

Flores et al., caracterizó las proteasas extracelulares de *Barrientosiiimonas sp. V9* mostrando actividad y estabilidad termal entre 30° y 50°C y disminuyó significativamente su actividad a 70 °C. Daoud en 2016 estudió la caracterización de la proteasa de *Halobacillus sp.CJ4*, esta revela actividad termal optima en el rango de 35 - 65°C. De acuerdo a los resultados las proteasas de las tres cepas de bacterias halófilas tienen un amplio rango de actividad cuando se le evalúa a diferentes temperaturas. Chamroensaksri et al., 2008 identifica a *Virgibacillus marismotui*, la cual presentó actividad proteasa óptima a 30°C. Proteasas de 17, 19, 24 y 35 kDa.

3.11. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Este ensayo se evaluó utilizando 4 sistemas buffers para determinar el pH óptimo en la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D. Los diferentes valores de pH están en un rango de 5.24 a 10.04, siendo las siguientes soluciones de sustrato utilizadas: acetato de sodio 0.1M, fosfato de sodio 0.1M, Tris-HCl 0.1 M y glicina-NaOH 0.1M.

Se realizó un zimograma copolimerizado con gelatina para determinar el efecto del pH óptimo en la actividad proteolítica de las proteasas de las cepas en estudio. Los resultados se muestran en las Figuras 22 - 25:

Figura 22

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Tampón Acetato de Na (pH 5.24)

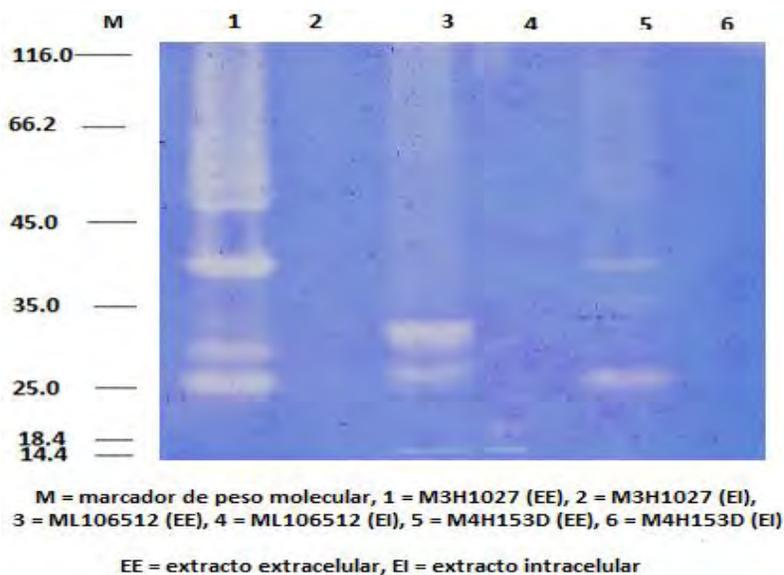


Figura 23

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Tampón fosfato de Na (pH 6.57)

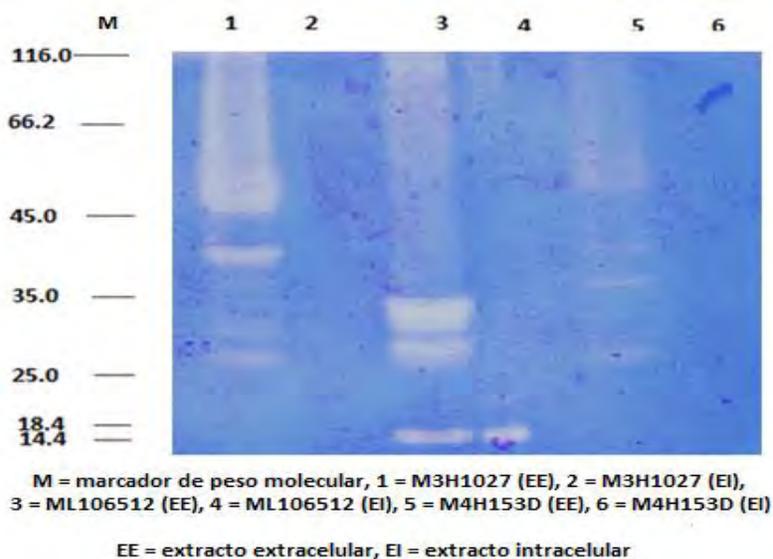


Figura 24

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Tampón Tris-HCl (pH 9.25)

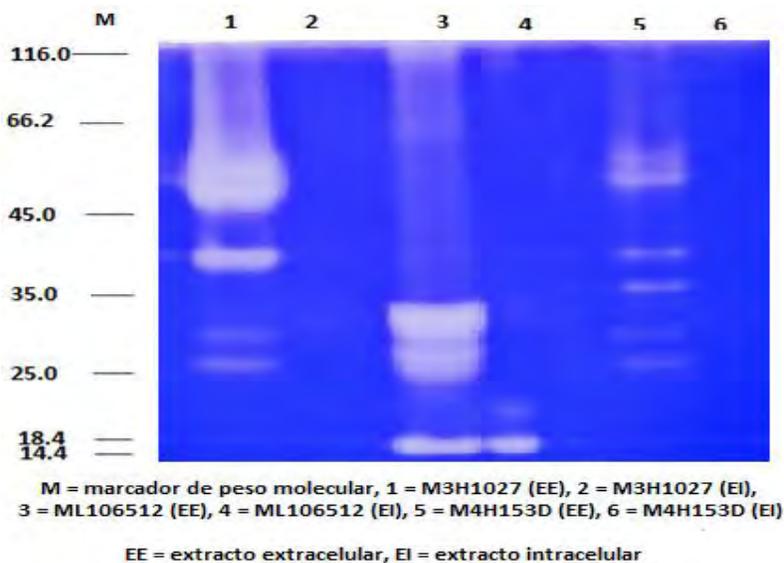
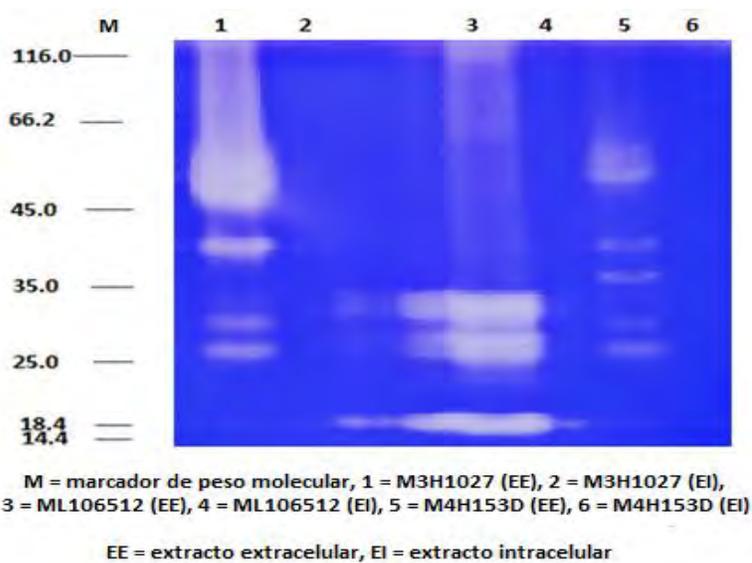


Figura 25

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Tampón Glicina NaOH (pH 10.04)



El análisis de la actividad también se realizó con el sistema de cruces.

Tabla 25

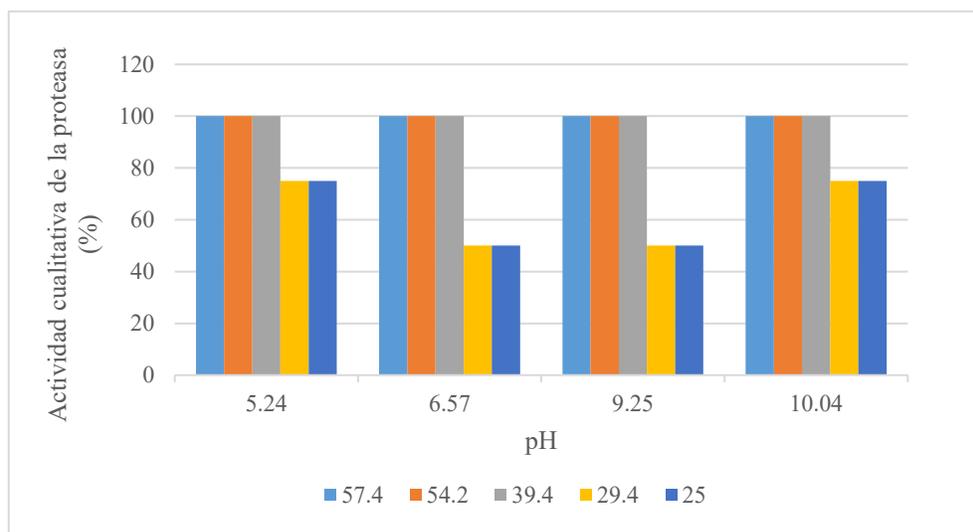
Efecto de pH en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027

| PM proteasas extracelulares (kDa) | Efecto del pH | | | |
|-----------------------------------------|---------------|---------------|-----------|--------------|
| | Acetato de Na | Fosfato de Na | Tris-HCl | Glicina NaOH |
| | (pH 5.24) | (pH 6.57) | (pH 9.25) | (pH 10.04) |
| 57.4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 54.2 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 39.4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 29.4 | +++ | ++ | ++ | +++ |
| 25 | +++ | ++ | ++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%

Figura 26

Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027



La tabla 25 muestra el efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa **M3H1027**, las proteasas de 57.4, 54.2 y 39.4 kDa muestran amplio rango de pH desde 5.24 hasta 10.04 por lo tanto actividad cualitativa de la proteasa es al 100%. Mientras que las proteasas

extracelulares de 29.4 y 25 kDa mantienen su actividad a 75 % frente a un pH de 5.24 y 10.04, pero decrece en un 50% a pH 6.57 y 9.25. En la figura 26 se muestra de forma gráfica los resultados de la evaluación a diferentes pH.

Tabla 26

Efecto del pH óptimo en la actividad proteolítica de la cepa ML106512

| Proteasas | PM (kDa) | Efecto del pH | | | |
|----------------|-------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | | Acetato de Na (pH 5.24) | Fosfato de Na (pH 6.57) | Tris-HCl (pH 9.25) | Glicina NaOH (pH 10.04) |
| EXTRACELULARES | 30.5 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| | 25 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| | 17.3 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| INTRACELULARES | 17.3 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, +++++ = 100%

Figura 27

Efecto del pH en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa ML106512

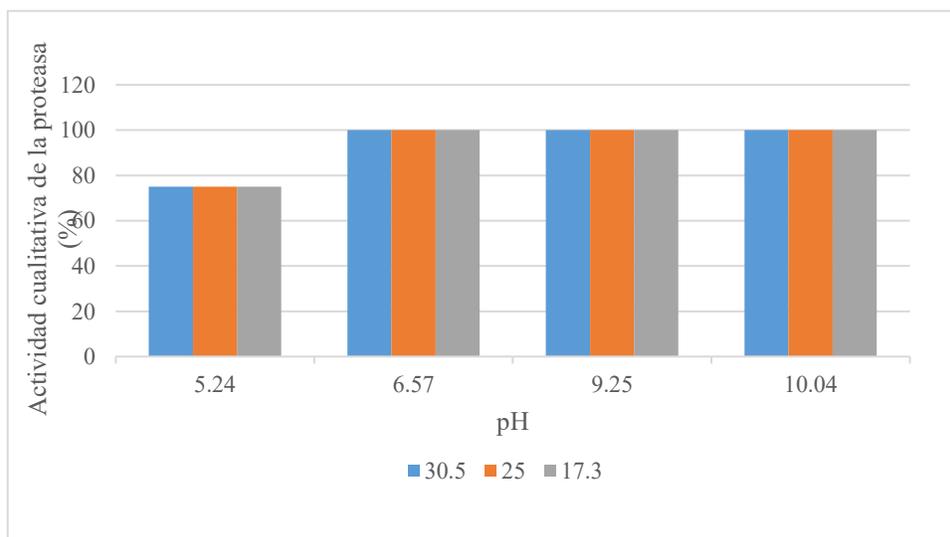
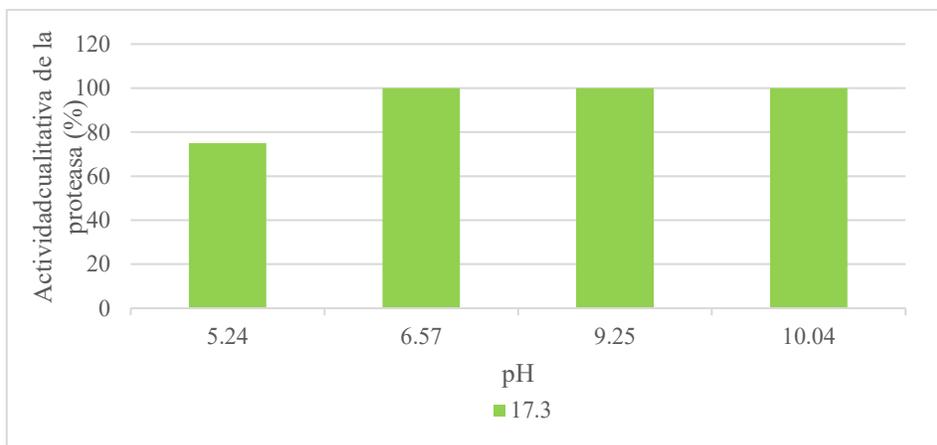


Figura 28

Efecto del pH en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa ML106512



La tabla 26 muestra el efecto del pH óptimo en la actividad proteolítica de la cepa **ML106512** y en las figuras 27 y 28 se ilustran los resultados obtenidos. Las proteasas extracelulares de 30.25, 25 y 17.3 kDa y la proteasa intracelular de 17.3 kDa muestran que la actividad alcanza un 75% al pH 5.24, luego incrementa al 100% de la actividad entre pH 6.57 y 10.04.

Tabla 27

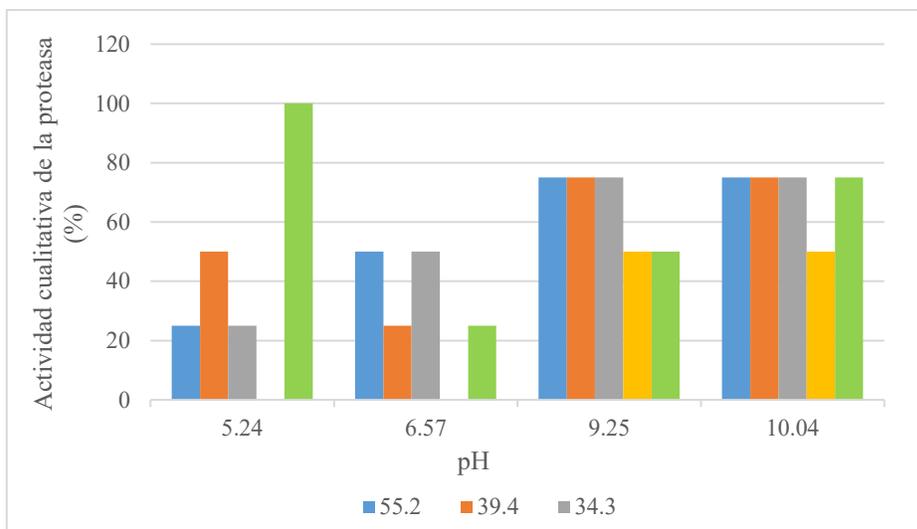
Efecto del pH óptimo en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D

| PM proteasas (kDa) | Efecto del pH | | | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | Acetato de Na (pH 5.24) | Fosfato de Na (pH 6.57) | Tris-HCl (pH 9.25) | Glicina NaOH (pH 10.04) |
| 55.2 | + | ++ | +++ | +++ |
| 39.4 | ++ | + | +++ | +++ |
| 34.3 | + | ++ | +++ | +++ |
| 27.7 | - | - | ++ | ++ |
| 24.1 | ++++ | + | ++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Figura 29

Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D



En la tabla 27, se muestra el efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa **M4H153D**, el efecto del pH de la banda de 55.2 y 34.3 kDa aumenta progresivamente desde un 25% hasta alcanzar el 100% de la actividad a pH 10.04, en la banda de 39.4 kDa la actividad empieza en un 50% a pH 5.24, pero a pH 6.57 decrece al 25% y finalmente el pH máximo que alcanza es a 9.25 y 10.04 mostrando el 75% de la actividad. Por otro lado, el pH de la banda de 27.7 kDa fue inhibida a pH 5.24 y 6.57 pero aumenta en un 50% de la actividad a pH 9.25 y 10.04 siendo óptima. Por último, la actividad de la banda más pequeña (24.1 kDa) inicia en un 100% a pH 5.24 por lo que sería su actividad óptima, luego decrece en 25% a pH 6.57 para luego aumentar progresivamente a pH 9.25 y 10.04.

Flores et al. (2019) muestra que la actividad proteolítica de las proteasas de 60, 45 y 35 kDa de *Barrientosimonas sp. V9* fue óptimo a pH 9.0 mientras que es estable en un rango de pH de 4.0 a 10.0. Daoud et al. (2016) reveló el efecto de pH en *Halobacillus sp.*, cepa CJ4 mostrando una actividad óptima a pH 9.0 y es altamente estable a lo largo de un rango de pH de 5.0 a 10.0.

3.12. EFECTO DE IONES METÁLICOS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se evaluó el efecto de los iones metálicos en la actividad proteasa realizando un zimograma copolimerizado con gelatina. Los iones metálicos utilizados fueron Ca^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} en una concentración de 5mM. En las figuras 30 - 34 se muestran los resultados de actividad de proteasas tanto en los extractos extracelulares (EE) como en los extractos intracelulares (EI) de las cepas en estudio M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Figura 30

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en presencia del ión CaCl_2

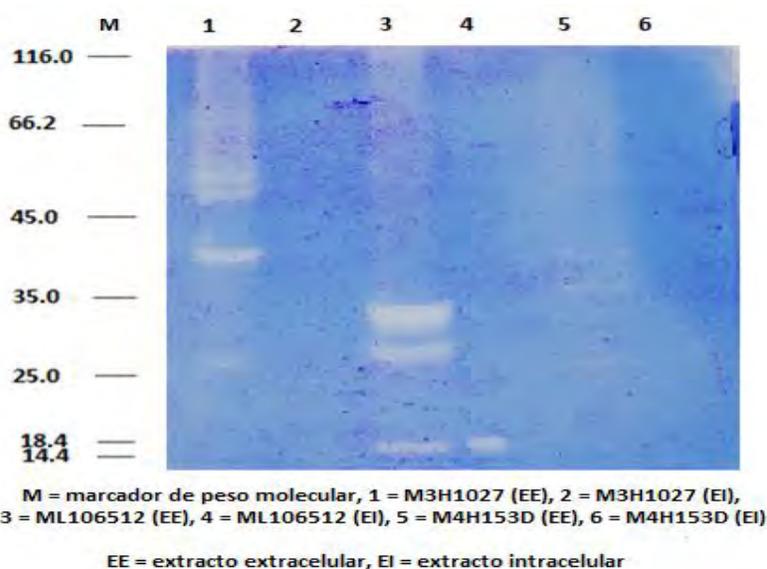


Figura 31

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a MgCl₂

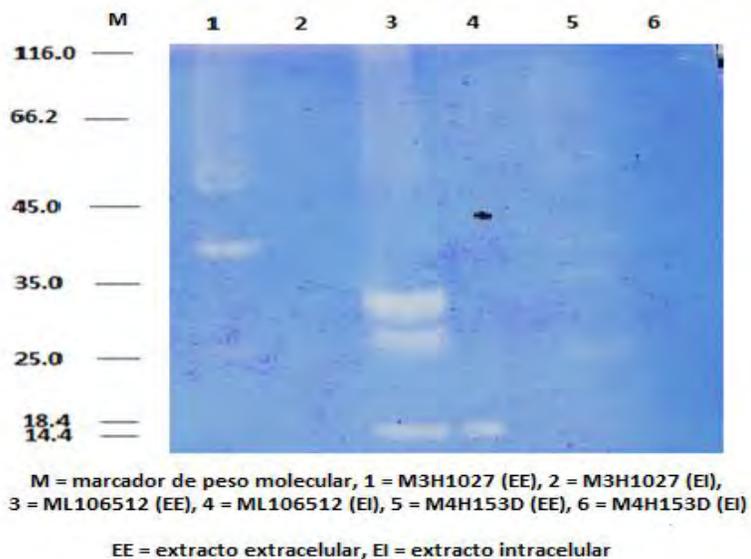


Figura 32

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a MnSO₄

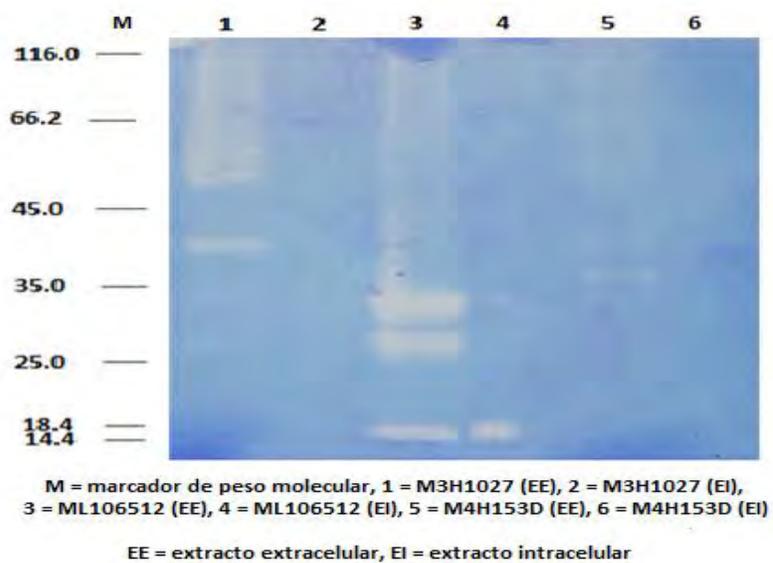


Figura 33

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a HgCl₂

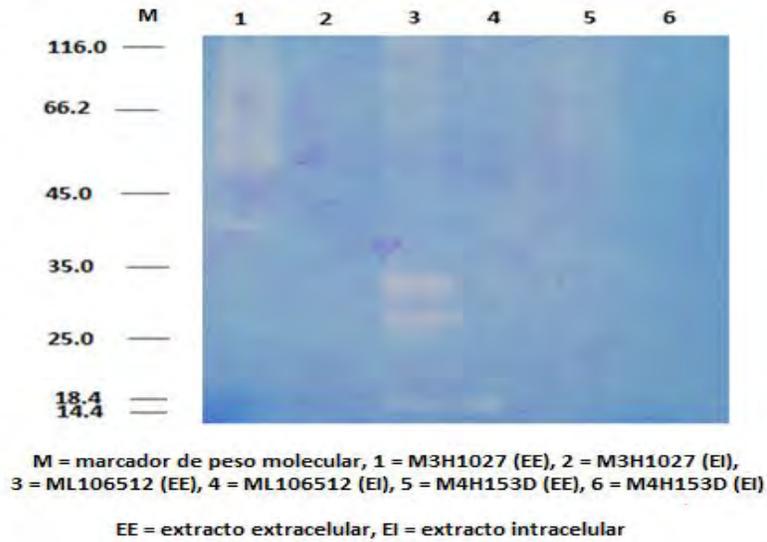


Figura 34

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D frente a CuSO₄

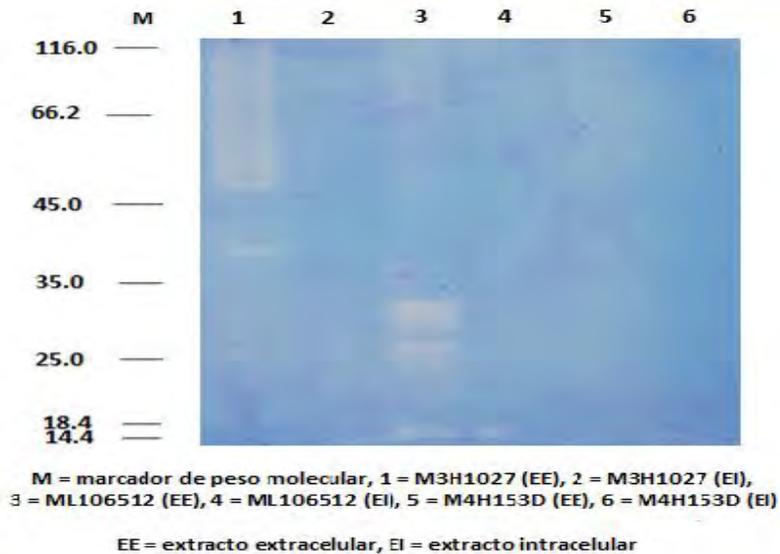
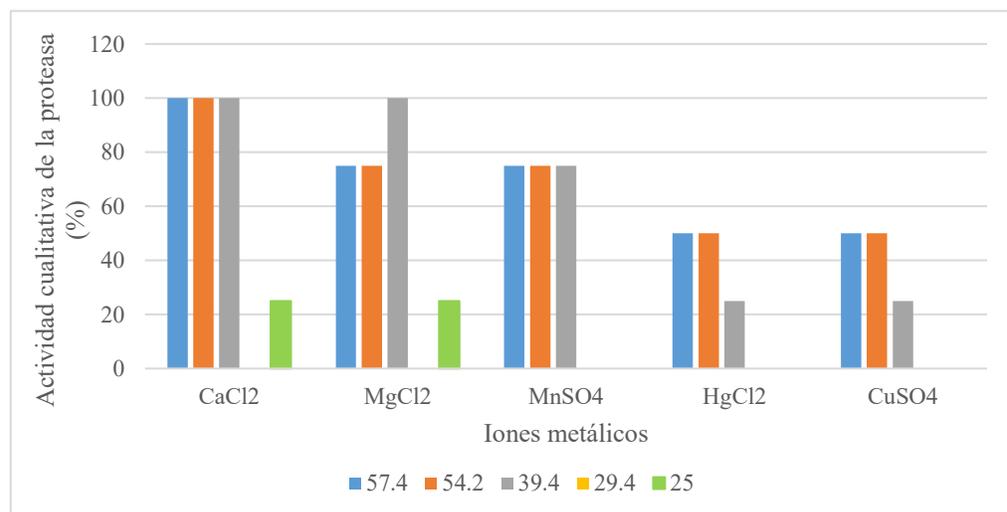


Tabla 28*Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027*

| PM proteasas (kDa) | Efecto de iones metálicos | | | | |
|-----------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | CaCl ₂ | MgCl ₂ | MnSO ₄ | HgCl ₂ | CuSO ₄ |
| 57.4 | ++++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 54.2 | ++++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 39.4 | ++++ | ++++ | +++ | + | + |
| 29.4 | - | - | - | - | - |
| 25 | + | + | - | - | - |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Figura 35*Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027*

Con los datos obtenidos de las figuras 30 - 35 y de la Tabla 28 se reveló la actividad proteolítica de las proteasas extracelulares de la cepa **M3H1027**. Las bandas de 57.4, 54.2 y 39.4 kDa alcanzan actividad más intensa al 100% por CaCl₂, pero decrece progresivamente hasta el 50 % con HgCl₂ y CuSO₄. Por otro lado, la actividad proteolítica de la proteasa extracelular de 29.4 kDa fue inhibida drásticamente por todos los iones metálicos utilizados. Finalmente, la proteasa de 25 kDa fue activada por CaCl₂, y MgCl₂, en un 25% de su

actividad, pero fue inhibida por $MnSO_4$, $HgCl_2$ y $CuSO_4$. Por otro lado, en el extracto intracelular no se observa actividad de ninguna de las proteasas presentes.

Tabla 29

Efecto de los iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa ML106512

| Proteasas | PM (kDa) | Efecto de iones metálicos | | | | |
|----------------|-------------|---------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | $CaCl_2$ | $MgCl_2$ | $MnSO_4$ | $HgCl_2$ | $CuSO_4$ |
| EXTRACELULARES | 30.5 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ |
| | 25 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ |
| | 17.3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ++ |
| INTRACELULARES | 17.3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, +++++ = 100%

Figura 36

Efecto de los iones metálicos en la actividad del extracto extracelular de la cepa ML106512

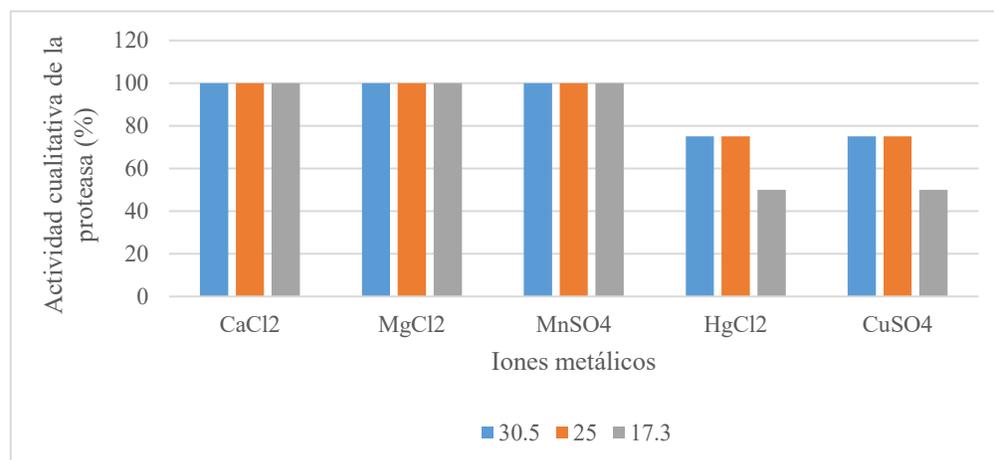
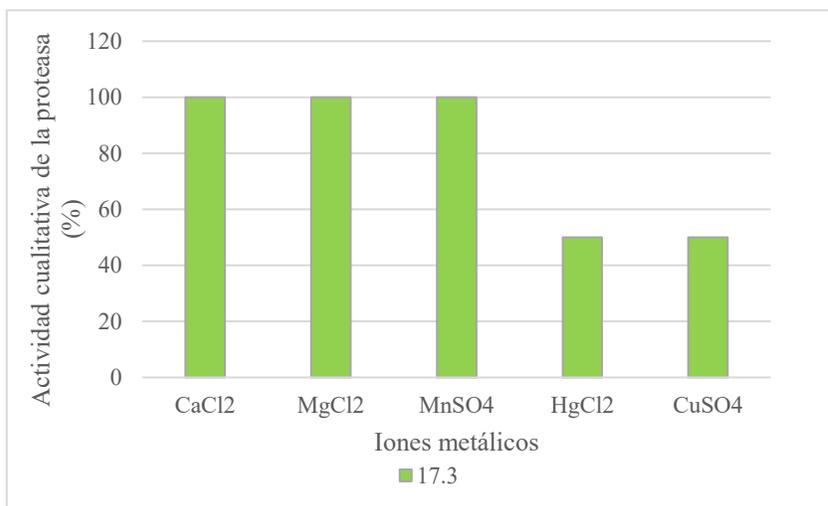


Figura 37

Efecto de los iones metálicos en la actividad del extracto intracelular de la cepa ML106512



El efecto de los iones metálicos en actividad proteolítica de las proteasas extracelulares e intracelulares obtenidas de la cepa **ML106512** se muestra en la Tabla 29 y la figura 36 la actividad de las proteasas extracelulares de 30.5 y 25 kDa es altamente activada frente a CaCl₂, MgCl₂, MnSO₄ alcanzando el 100 % pero decrece hasta el 75 % de la actividad frente a HgCl₂ y CuSO₄. Por otro lado, la actividad proteolítica de la proteasa extracelular e intracelular de 17.3 kDa es óptima al 100 % frente a CaCl₂, MgCl₂, MnSO₄ y reduce en 50 % frente a HgCl₂ y CuSO₄.

Tabla 30

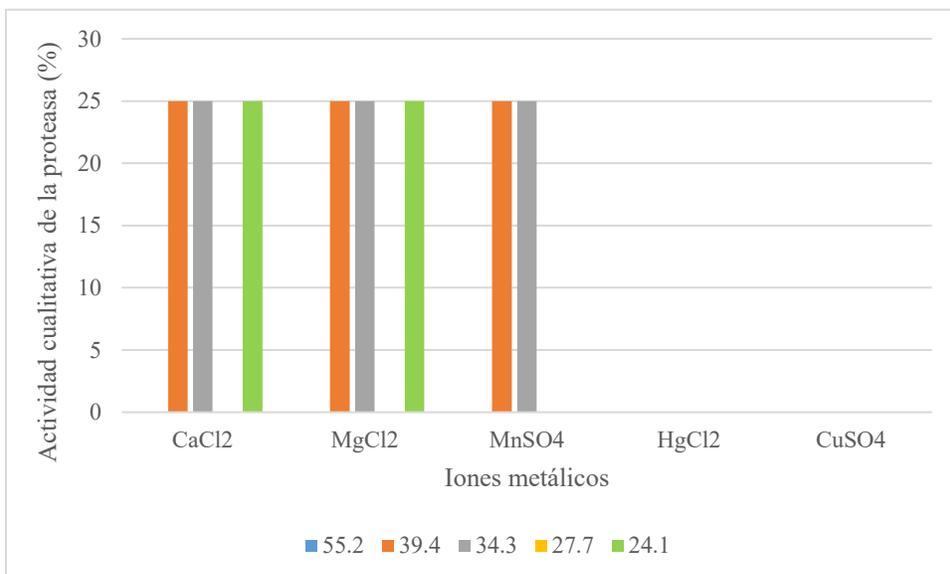
Efecto de los iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D

| PM proteasas (kDa) | Efecto de iones metálicos | | | | |
|-----------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | CaCl ₂ | MgCl ₂ | MnSO ₄ | HgCl ₂ | CuSO ₄ |
| 55.2 | - | - | - | - | - |
| 39.4 | + | + | + | - | - |
| 34.3 | + | + | + | - | - |
| 27.7 | - | - | - | - | - |
| 24.1 | + | + | - | - | - |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Figura 38

Efecto de los iones metálicos en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D



La Tabla 30 muestra el efecto de los iones metálicos en la actividad proteasa de la cepa **M4H153D**, reveló que las proteasas extracelulares de 39.4, 34.3 kDa mostraron una ligera actividad del 25 % frente a CaCl₂, MgCl₂ y MnSO₄ y se inhibieron frente a HgCl₂ y CuSO₄. Por otro lado, la actividad proteolítica de la proteasa extracelular de 24.1 kDa es ligeramente estimulada al 25 % de la actividad por CaCl₂ y MgCl₂, pero fue inhibida frente a MnSO₄, HgCl₂ y CuSO₄. Y finalmente la actividad proteolítica de las bandas de 55.2 kDa Y 27.7 kDa se inhibió totalmente frente al efecto de los iones metálicos (CaCl₂, MgCl₂ y MnSO₄, HgCl₂ y CuSO₄)

Barrientosiiomonas sp. cepa V9 (Flores et al., 2019) la actividad proteolítica fue estable en la presencia de a Ca²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ y Ba²⁺ mientras que hubo poca actividad o fue decreciendo por Co²⁺ y Hg²⁺. Por otro lado, en el estudio que realizó Daoud *et al.* 2016, las proteasas de 30 - 80 kDa de *Halobacillus* sp. CJ4 revelaron actividad altamente estimulada frente a Ca²⁺, Mg²⁺ y Ba²⁺ pero fue totalmente inhibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ y Fe²⁺.

3.13. EFECTO DE NaCl EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

El efecto de la sal en la actividad proteasa realizando un zimograma copolimerizado con gelatina se evaluó frente a diferentes concentraciones de NaCl que va desde 0 a 20%. Los

resultados se muestran en las figuras 39 - 41. Los extractos evaluados son extracelulares (EE) e intracelulares (EI) y en las figura y tablas se presentan los resultados globales correspondientes a la evaluación de la acción del NaCl en la actividad enzimática de las proteasas de los extractos de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D.

Figura 39

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D con 0% NaCl

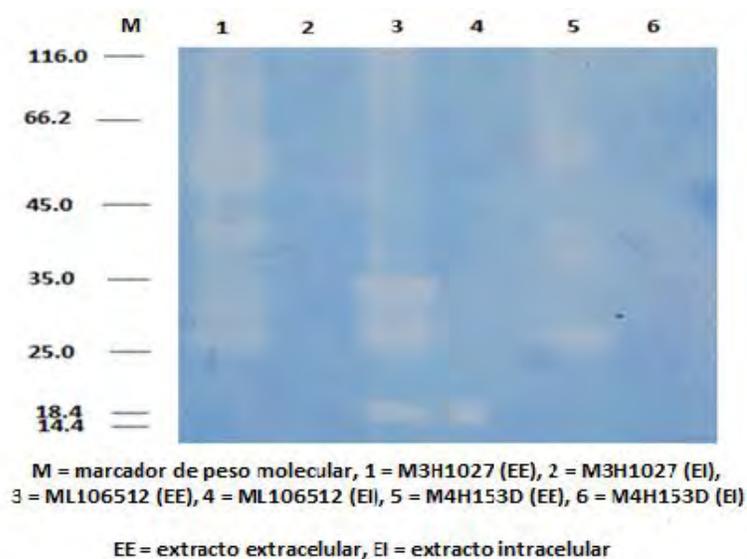


Figura 40

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en presencia de 10% NaCl

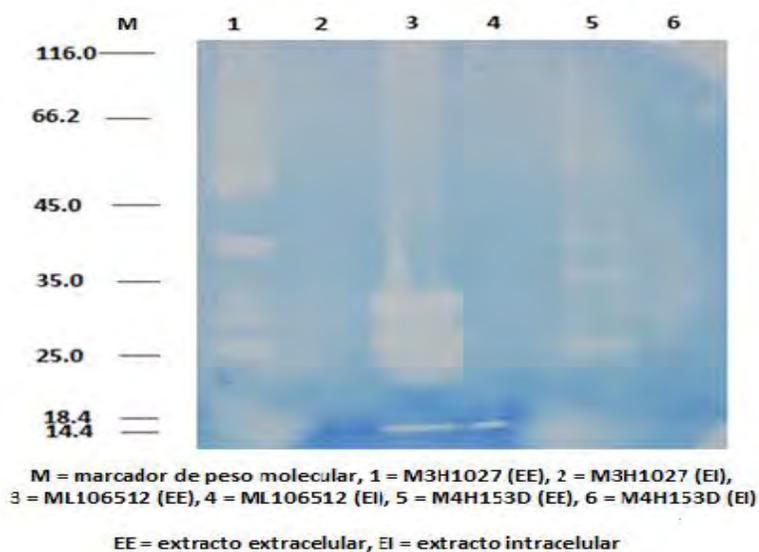


Figura 41

Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D en presencia de 20% NaCl

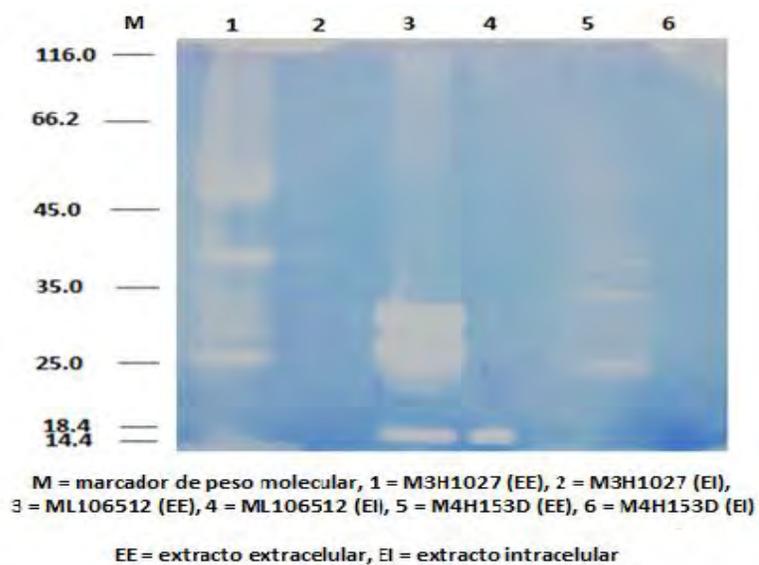
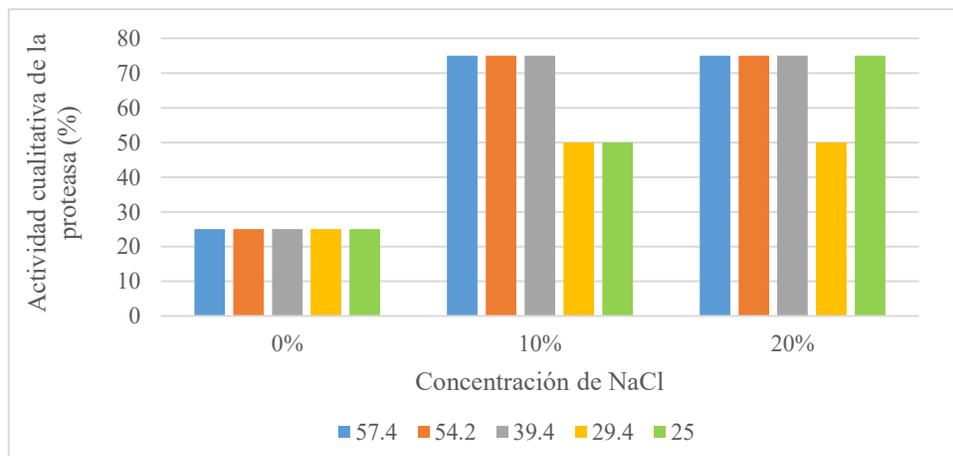


Tabla 31

Efecto de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027

| PM proteasas Extracelulares (kDa) | Efecto del NaCl | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----|-----|
| | 0% | 10% | 20% |
| 57.4 | + | +++ | +++ |
| 54.2 | + | +++ | +++ |
| 39.4 | + | +++ | +++ |
| 29.4 | + | ++ | ++ |
| 25 | + | ++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%

Figura 42*Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M3H1027*

La Tabla 31 y la figura 42 muestran el efecto de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa **M3H1027**, las proteasas extracelulares de 57.4, 54.2, 39.4 kDa muestran el 25 % de la actividad proteolítica a 0% de NaCl y aumenta hasta el 75 % frente al 10 y 20 % de NaCl. La actividad de la proteasa de 29.4 kDa inicia al 25 % frente a 0 % de concentración de NaCl e incrementa al 50% frente al 10 y 20 %. Por último, la banda de 25kDa muestra el 25 % de la actividad a 0 % de NaCl, aumenta progresivamente su actividad hasta alcanzar el 75 % frente al 20 % NaCl.

Tabla 32

Efecto del NaCl en la actividad proteolítica de la cepa ML106512

| Proteasas | PM (KDA) | Efecto de NaCl | | |
|----------------|-------------|----------------|------|------|
| | | 0% | 10% | 20% |
| EXTRACELULARES | 30.5 | +++ | ++++ | ++++ |
| | 25 | +++ | ++++ | ++++ |
| | 17.3 | +++ | ++++ | ++++ |
| INTRACELULARES | 17.3 | +++ | ++++ | ++++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%

Figura 43

Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica del extracto extracelular de la cepa ML106512

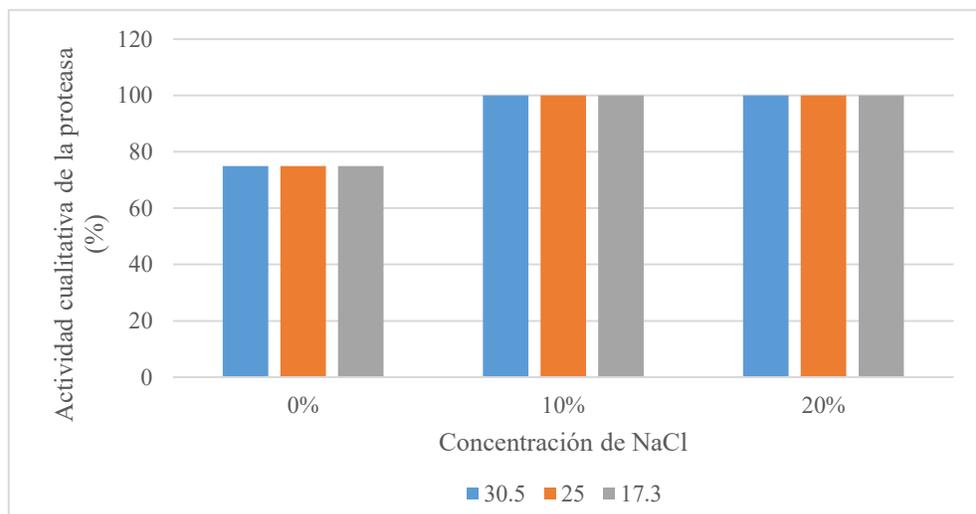
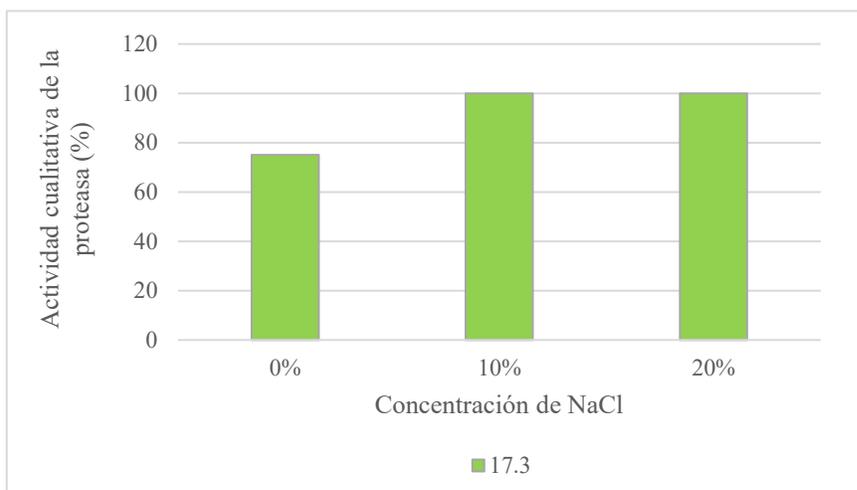


Figura 44

Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica del extracto intracelular de la cepa ML106512



El efecto del NaCl en la actividad proteolítica de la cepa **ML106512** fue estudiada bajo el rango de 0 - 20 %. Como se muestra en la tabla 32 y las figuras 43 y 44, la actividad proteolítica de las bandas extracelulares 30.5, 25 y 17.3 kDa e intracelular de 17.3 kDa inicia en un 75 % de la actividad cualitativa frente a 0 % NaCl e incrementa hasta el 100 % mostrando una actividad óptima frente a 10 y 20 % NaCl.

Tabla 33

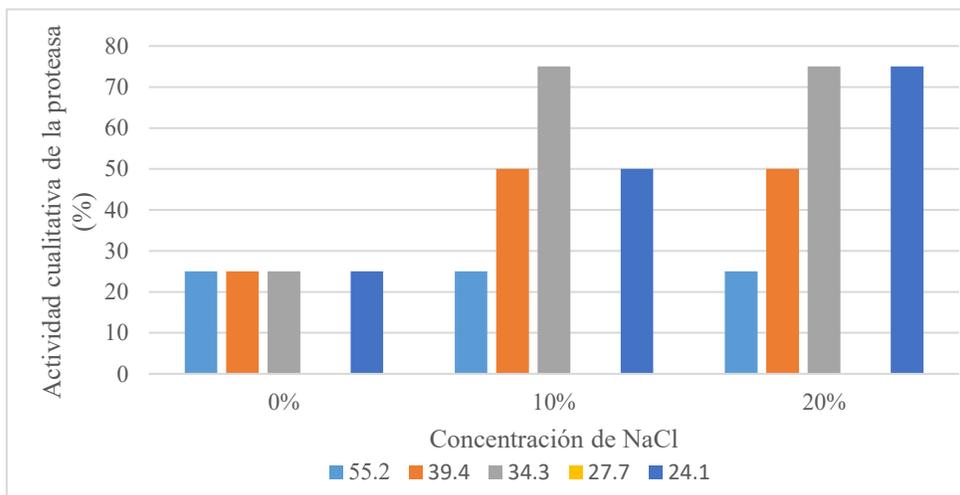
Efecto del NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D

| PM proteasas (kDa) | Efecto de NaCl | | |
|-----------------------|----------------|-----|-----|
| | 0% | 10% | 20% |
| 55.2 | + | + | + |
| 39.4 | + | ++ | ++ |
| 34.3 | + | +++ | +++ |
| 27.7 | - | - | - |
| 24.1 | ++ | +++ | +++ |

+ = 25%, ++ = 50 %, +++ = 75%, ++++ = 100%, - = no hay actividad

Figura 45

Efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa M4H153D



En la Tabla 33 y figura 45 se muestra el efecto de NaCl en la actividad proteolítica de la cepa **M4H153D**. La banda de mayor peso molecular (55.2 kDa) mostró que su actividad proteolítica se mantuvo estable al 25 % en un rango de NaCl del 0 – 20 %. Mientras que en la banda de 27.7 kDa, la actividad es inhibida en su totalidad frente a un rango de 0 – 20 % NaCl. Todo lo contrario, sucede con las otras bandas, la de 39.4 kDa inicia con un 25 % de actividad cualitativa al 0% NaCl e incrementa hasta un 50 % frente al 10 y 20 % de NaCl; la actividad cualitativa de la banda de 34.3 kDa inicia en un 25 % al 0% NaCl y aumenta hasta el 75% frente al 10 y 20 % NaCl; por último, la banda de 24 kDa reveló que su actividad cualitativa al 0%NaCl inicia en un 50 % e incrementa frente al 10 y 20 % NaCl en un 75%.

Por otro lado, Flores *et al.*, reveló que las proteasas producidas por *Barrientosimonas* sp V9 mostraron que la actividad se mantuvo a 0.5 y 1.5M de NaCl y de 2 a 2.5M la actividad fue disminuyendo. Daoud *et al.*, mostró que el efecto de sal en la actividad proteasa de *Halobacillus* sp. CJ4 fue evaluada en un rango de 0 - 5M, la actividad óptima de las proteasas de 30 – 80 kDa alcanzó a 0.4M NaCl.

CONCLUSIONES

1. Las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D presentan actividad proteolítica cualitativa cuando hidroliza sustratos de gelatina y caseína, siendo la gelatina el mejor sustrato donde presentan mejor actividad proteolítica.
2. Se determinó la actividad semicuantitativa de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D utilizando como sustrato gelatina y caseína. En la actividad semicuantitativa del extracto extracelular se obtuvieron los halos de hidrólisis en sustrato gelatina de 6.32 mm, 8.41 mm y 15.87 mm para las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D respectivamente, y para el sustrato caseína de 2.48 mm, 4.55 mm y 2.59 mm para las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D respectivamente. Y en la actividad semicuantitativa del extracto intracelular en sustrato gelatina, los halos de hidrólisis para las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D fueron de 1.37 mm, 3.03 mm y 4.81 mm respectivamente, y en sustrato caseína los halos de hidrólisis para las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D fueron de 1.55 mm, 2.01 mm y 2.76 mm respectivamente.
3. Se caracterizaron las proteasas extracelulares de las cepas M3H1027, ML106512 y M4H153D:
 - La cepa M3H1027 presenta 5 proteasas extracelulares cuyos tamaños moleculares son de 25 kDa, 29.4kDa, 39.4kDa, 54.2kDa y 57.4 kDa. Las proteasas de 25 kDa, 29.4kDa, 39.4kDa, 54.2kDa son serín-cisteín y no se pudo determinar la identidad de la proteasa de 57.4 kDa porque no se inhibe con ninguno de los cuatro inhibidores utilizados. En cuanto a su actividad termal, las proteasas de mayor tamaño (54.2 y 57.4) kDa tienen mejor actividad entre 40 – 70°C, la proteasa de 39.4kDa muestra amplio rango de temperatura (4 – 70°C), la de 29.4 y 25 kDa muestran mayor actividad a 70°C. El pH óptimo de las proteasas de 57.4, 54.2 y 39.4 kDa es activa frente a los 4 sistemas buffer, mientras que las proteasas de 29.4 y 25 kDa mantienen su actividad bajo el efecto de acetato de sodio y glicina NaOH. Las proteasas de 57.4, 54.2 y 39.4 kDa fueron altamente activadas por CaCl₂, MgCl₂, MnSO₄; la de 29.4 kDa fue inhibida drásticamente por todos los iones

metálicos utilizados; y la proteasa de 25 kDa fue activada por CaCl_2 y MgCl_2 . Finalmente, las 5 proteasas muestran actividad frente a 10 y 20% NaCl.

- La cepa ML106512 presenta 3 proteasas extracelulares cuyos tamaños moleculares son de 17.3 kDa, 25 y 30.5 kDa. Las 2 proteasas de mayor tamaño (25 y 30.5 kDa) no presentan inhibición frente a los inhibidores utilizados en este estudio. Posee actividad termal óptima desde 4-70°C, pH óptimo desde 6.57 - 10.04, y concentración de NaCl óptimo a 10 y 20%. Mostró alta actividad proteolítica frente a Ca^{2+} , Mg^{2+} .y Mn^{2+} . Por otro lado, la proteasa extracelular de 17.3kDa se confirmó como cisteín proteasa, mostró actividad termal óptima hasta 70°C, posee un rango de pH óptimo desde 6.57 - 10.04, concentración de NaCl óptimo a 10 y 20% y alta actividad frente a Ca^{2+} , Mg^{2+} .y Mn^{2+} .
 - La cepa M4H153D presenta 5 proteasas extracelulares cuyos tamaños moleculares son de 24.1 kDa, 27.7 kDa, 34.3kDa, 39.4kDa y 55.2 kDa. La proteasa de mayor tamaño (55.2kDa) no es inhibida por ninguno de los 4 inhibidores, las proteasas de 39.4, 34.3 y 24.1 kDa son metalo y serín-cisteín proteasas, y la proteasa de 27.7 kDa es una serín-cisteín proteasa. En cuanto a la actividad termal la proteasa de 55.2 kDa alcanza su mayor actividad a 70°C, las de 39.4, 34.3 y 24.1 kDa alcanzan un rango de temperatura óptimo entre 30 – 70°C y la de 27.7 kDa no muestra ninguna actividad. Por otro lado, la actividad de las proteasas de 27.7, 34.3, 39.4 y 55.2 frente al pH es óptimo a 9.25 y 10.04, mientras que la de 24.1 es óptima a pH 5.24. La actividad de las proteasas de 39.4, 34.3 kDa frente a los iones metálicos solo es ligeramente activa por CaCl_2 , MgCl_2 y MnSO_4 , la de menor tamaño (24.1 kDa) es ligeramente estimulada por CaCl_2 y MgCl_2 , mientras que la actividad de las proteasas 55.2 kDa Y 27.7 kDa se inhibió totalmente. Finalmente, el efecto del NaCl es progresiva en las proteasas de 39.4 kDa, 34.3 kDa y 24.1 kDa, la de mayor tamaño (55.2 kDa) se mantiene estable frente a 0, 10 y 20 % de NaCl, y en la banda de 27.7kDa la actividad proteolítica es inhibida en su totalidad.
4. Se caracterizó la proteasa intracelular de la cepa ML106512 cuyo peso molecular es de 17.3kDa, se confirmó como cisteín proteasa, mostró actividad termal óptima hasta 70°C, posee un rango de pH óptimo desde 6.57 - 10.04, concentración de NaCl óptimo a 10 y 20% y alta actividad frente a Ca^{2+} , Mg^{2+} .y Mn^{2+} .

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar otros sustratos como azocaseína para evaluar la actividad enzimática.
2. Se recomienda utilizar otros inhibidores de proteasas.
3. Se recomienda identificar las cepas seleccionadas mediante pruebas moleculares.
4. Se recomienda probar más concentraciones de NaCl e incorporar algunos metales iónicos tales como cloruro de cobalto, cloruro de bario, sulfato de hierro, y otros para mejorar la actividad proteolítica de las proteasas.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbarabadi E. A., Vardanjani H. R., Molavinia S., Pashmforoosh M. & Khodayar M. J. (2021). PMSF Attenuates Morphine Antinociceptive Tolerance and Dependence in Mice: Its Association with the Oxidative Stress Suppression. *Iran J Pharm Res*, 20(3):300-309.
- Alnahdi, H. S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus sp.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 71-74.
doi:10.7324/JAPS.2012.2915
- Aoyagi, T.; Miyata, S., Nanbo M., Kojima, F., Matsuzaki, M. Ishizuka, M., Takeuchi T. & Umezawa H. (1969). Biological activities of leupeptins. *J. Antibiotics*, 22: 558-568
- Ardakani, M. R., Poshtkoughian, A., Amoozegar, M. A., & Zolgharnein, H. (2012). Isolation of Moderately Halophilic Pseudoalteromonas Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes from Persian Gulf. *Indian J Microbiol*, 94-98. doi:10.1007/s12088-011-0243-x
- Awad, H. M., Mostafa, E.-S. E., Saad, M. M., Selim, M. H., & Hassan, H. M. (2013). Partial purification and characterization of extracellular protease from a halophilic and thermotolerant strain *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15. *Indian Journal of Biochemistry-Biophysics*, 50, 305-311.
- Bradford, 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.
- Canales, P. E., Chávez-Hidalgo, E. L., & Zavaleta, A. I. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas. *Revista colombiana de Biotecnología*, 16(2), 150-157.
- Chamroensaksri, N., Akaracharanya A. & Tanasupawat S. (2008). Characterization of halophilic bacterium NB2-1 from Pla-Ra and its protease production. *Journal of Food Biochemistry* 32(4), 536 – 555. doi: 10.1111/j.1745-4514.2008.00183.x

- Choi, N. S., Yoon, K. S., Lee, J. Y., Han, K. Y., & Kim, S. H. (2001). Comparison of three substrates (Casein, Fibrin and Gelatin) in Zymographic gel. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34(6), 531-536.
- Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M., & Enache, M. (2009). Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*, 4658-4664.
- Dammak, D. F., Smaoui, S. M., Ghanmi, F., Boujelben, I., & Maalej, S. (2016). Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 337-346. doi:10.1002/jobm.201500475
- Daoud, L., Jlidi, M., Hmani, H., Brahim, A. H., Arbi, M. E., & Ali, M. B. (2016). Characterization of thermo-solvent stable protease from *Halobacillus sp.* CJ4 isolated from Chott Eldjerid hypersaline lake in Tunisia. *Journal of Basic Microbiology*, 1-10. doi:10.1002/jobm.201600391
- Delgado-García M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-González CN, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J. Sci. Food Agric.*, 92(13): 2575-2580
- Del Maestro Morales, M. C., & Guzmán Campos, J. M. (2015). Efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de los sustratos almidón y caseína por las bacterias halófilas aisladas de los estanques salinos de la caleta Santa Rosa. Tesis, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque.
- Desai, D., & Vyas, T. K. (2014). Alkaline protease production by thermophilic and alkalophilic halotolerant *Bacillus sp.* strain TD: a promising enzyme producer for biotechnological application. *Trends in Biotechnology Research*, 3(1), 12-17.
- Dowdle, C. H. (1980). Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. *Analytical biochemistry*, 102, 196-202.

- Elbanna, K., Ibrahim, I. M., & Revol-Junelle, A.-M. (2015). Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium sp.* strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. *Extremophiles*, *19*, 763–774. doi:10.1007/s00792-015-0752-3
- Flores, M. L., Zavaleta, A. I., Zambrano, Y., Cervantes, L., & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e investigación*, *13*(1), 42-46.
- Flores-Santos, J. C., Zavaleta, A. I., Flores-Fernández, C. N., Chavez-Hidalgo, E., Izaguirre, V., & A., B. (2019). Production and characterization of extremophilic proteinases from a new enzyme source, *Barrientosiimonas sp.* V9. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03140-9>
- Gárate Palomino, Á. (2016). Obtención y caracterización de proteasas de excreción a partir de bacterias halófilas aisladas de las salineras de Maras. UNSAAC. Cusco: Tesis de investigación para optar al título profesional de Biólogo
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The Biocatalytic Potential of Extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol*, 223-235.
- Grzegorz, D. (2002). Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* *Biol. Chem.* *7*, 383. Doi: 10.1515/BC.2002.116
- Gupta, R., Beg Q., Khan S. & Chauhan B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(4), 381–395. doi:10.1007/s00253-002-1142-1
- Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., & Tanaka, I. (1978). Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(3), 523-528. doi:10.1080/00021369.1978.1086301
- Huaihua Puma, P. (2018). Purificación, caracterización e inmovilización de proteasas de excreción de *Staphylococcus sp.* de las salineras de Maras - Cusco, UNSAAC, Cusco. Tesis de investigación para optar al título profesional de Biólogo

- Jácome, S. (2018). Caracterización de bacterias halófilas de la mina de sal en la parroquia salinas del Cantón Guaranda. Tesis de investigación. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- James, G. T. (1978). Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*, 86(2), 574–579. doi:10.1016/0003-2697(78)90784-4
- Janecki, D. J., & Reilly, J. P. (2005). Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(10), 1268–1272. doi:10.1002/rcm.1924
- Janson, J.C. & Rydén, L. (2008). Protein separation and purification, *Biotechnology Set*, Second Edition, 617-642
- Karbalaei-Heidari, H. R., Amoozegar, M. A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.-A., & Ventosa, A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 21–27. doi:10.1007/s10295-008-0466-y
- Karbalaei-Heidari, H. R., Ziaee, A.-A., Schaller, J., & Amoozegar, M. A. (2007). Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio sp.* strain AF-2004. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 266–272. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.04.006
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2
- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S., & Khare, S. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1595-1603.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. 317-368.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- León, M. (2018). Determinación de proteasas extracelulares e intracelulares de bacterias halófilas obtenidas de Huanoquite y Acos, provincias de Paruro y Acomayo, Cusco. Seminario de investigación, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.
- Lingaraju, M. H., & Gowda, L. R. (2008). A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(5), 850-855. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.02.013
- Madigan, M., & y Oren, A. (2009). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol*, 2, 265-269.
- Mala, B., Aparna, M., Mohini, S., & Vasanti, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Mala, M., & Srividya, S. (2010). Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. *Indian J Microbiol*, 309–317. doi: 10.1007/s12088-010-0024-y
- Maruthiah, T., & Palavesam, A. (2016). Characterization of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease for chitin extraction from shrimp shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 552-560.
- Mathews, K., van Holde, G., & y Ahern, A. (2002). *Bioquímica*. Barcelona: Pearson Addison Wesley.
- Matsumoto K., Mizoue K., Kitamura K., Tse W. C., Huber C. P., & Ishida T. (1999). Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers*, 51(1), 99-107. doi:10.1002/(sici)1097-0282(1999)51:1<99: aid-bip11>3.0.co;2-r
- Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Bachir, A. S., Sánchez, M. M. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated

from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 207, 289-298.

Moreno, M. d., García, M. T., Ventosa, A., & Mellado, E. (2009). Characterization of *Salicola sp.* IC10, a lipase and protease producing extreme halophile. (R. Laanbroek, Ed.) *Federation of European Microbiological Societies*, 59-71. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00651.x

Mostafa, E.-S. E., Saad, M. M., Awad, H. M., Selim, M. H., & Hassan, H. M. (2012). Optimization Conditions of Extracellular Proteases Production from a Newly Isolated *Streptomyces Pseudogrisiolus* NRC-15. *E-Journal of Chemistry*, 949-961.

Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V. & Weil P. (2010). Harper Bioquímica Ilustrada. Mc Graw Hill Lange. 29, 58.

Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tsunemi, M., Tanasupawat, S., & Oda, O. (2006). A Halophilic Serine Proteinase from *Halobacillus sp.* SR5-3 Isolated from Fish Sauce: Purification and Characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(6), 1395-1401. doi:10.1271/bbb.50658

Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 825-834. doi: 10.1080/09593330903370026

Pitt, T., & Dey, D. (1970). A Method for the Detection of Gelatinase Production by Bacteria. *J. appl. Bact.*, 33, 687-691.

Porro, C. S., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., & Ventosa, A. (2003). Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium. *Extremophiles*, 7, 221-228. doi:10.1007/s00792-003-0316-9

Purushothaman, K., Bhat, S. K., Siddappa, S., Singh, S. A., Subbaiah, R., Marathe, G. K., & Rao G Appu Rao, A. (2021). Aspartic protease-pepstatin A interactions: Structural insights on the thermal inactivation mechanism. *Biochimie*, 189, 26-39. doi: 10.1016/j.biochi.2021.06.002

- Ramirez, N., Serrano, J., Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 56-71.
- Rasooli, M., Amoozegar, M. A., Sepahy, A. A., Babavalian, H., & Tebyanian, H. (2016). Isolation, Identification and Extracellular Enzymatic Activity of Culturable Extremely Halophilic Archaea and Bacteria of IncheBoroun Wetland. *International Letters of Natural Sciences*, 56, 40-51.
- Sánchez, T., León, J., Woolcott, J., & Arauco, K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de. *Revista peruana de biología*, 11(2), 179-186.
- Seung-Ho, K., Nack-Shick, C., & Woo-Yiel, L. (1998). Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels. *Analytical Biochemistry*, 263, 115-116. doi:0003-2697/98 \$25.00
- Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 23(5), 259-262. doi:10.7164/antibiotics.23.259
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of General Microbiology*, 128, 1959-1968.
- Xin, L., Hui-Ying, Y., Xiao-Xue, L., & Xiao, S. (2011). Production and characterization of a novel extracellular metalloproteinase by a newly isolated moderate halophile, *Halobacillus sp.* LY6. *Folia Microbiol*, 56, 329–334. doi:10.1007/s12223-011-0046-9
- Xin, L., & Hui-Ying, Y. (2012). Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salinicrobium halophilum* strain LY20. *Fems Microbiol*, 2, 329. Doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02522.x

- Xiong, H., Song, L., Song, L., Tsoi, M.-Y., Dobretsov, S., & Qian, P.-Y. (2007). Characterization of proteolytic bacteria from the Aleutian deep-sea and their proteases. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 63–71. doi:10.1007/s10295-006-0165-5
- Yu, Z.-L., Zeng, W.-C., Zhang, W.-H., Liao, X.-P., & Shi, B. (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and its mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 495-501. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.11.06

ANEXO N°1

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (Bradford, 1976)

- Utilizar como estándar 1 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva de calibración como indica en la tabla:

Preparación de la curva de calibración utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de BSA por el método de Bradford

| BSA ($\mu\text{g/ml}$) | BSA $\mu\text{g/ml}$ (μl) | H ₂ O DESTILADA | REACTIVO BRADFORD (μl) |
|--------------------------|----------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 0 | 500 | 500 |
| 1.25 | 6.25 | 493.75 | 500 |
| 2.5 | 12.5 | 487.5 | 500 |
| 5 | 25 | 475 | 500 |
| 7.5 | 37.5 | 462.5 | 500 |
| 10 | 50 | 450 | 500 |

- Preparar las muestras utilizando 50 μl y 100 μl de extracto extracelular e intracelular completando con 450 μl y 400 μl de agua destilada.
- Agregar 500 μl del reactivo Bradford y remover la mezcla sin permitir la formación de burbujas.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Calcular y medir la concentración de proteínas a 595 nm de longitud de onda.

ANEXO N°2

PREPARACIÓN DEL GEL PARA SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

- Para la preparación del gel separador o de resolución al 10% mezclar los reactivos, sin la adición del TEMED y el APS 10%, como se observa en la tabla. Luego integrar estos catalizadores para iniciar la polimerización y verter inmediatamente la solución en los moldes de vidrio. Agregar 1 ml aproximadamente de agua destilada para que la polimerización se realice en condiciones anaeróbicas durante 15-20 minutos.

Componentes del gel separador o de resolución 10%

| Reactivo | Cantidad (µl) |
|--------------------------|---------------|
| Agua destilada estéril | 2500 |
| Tris 1.5M (pH 8.8) | 1490 |
| Acrilamida/Bisacrilamida | 1990 |
| SDS 10% | 130 |
| APS 10% | 30 |
| TEMED | 10 |

- Después de que se torne visible la interfase entre el polímero y el agua, esperar 10-15 minutos adicionales para que se complete la reacción. Luego, decantar el exceso de líquido de la superficie.
- Preparar el gel de apilamiento o compactador al 5% como indica la tabla, inmediatamente después de agregar los catalizadores, mezclar y verter en el molde, nivelando el peine con cuidado en su posición horizontal. finalmente dejar polimerizar durante 15-20 minutos.

Componentes del gel de apilamiento o compactador al 5%

| Reactivo | Cantidad (μ l) |
|--------------------------|---------------------|
| Agua destilada estéril | 1950 |
| Tris 0.5M (pH 8.8) | 744 |
| Acrilamida/Bisacrilamida | 302 |
| SDS 10% | 40 |
| APS 10% | 40 |
| TEMED | 10 |

- Quitar el peine suavemente.
- Preparar las muestras. Mezclar con el amortiguador de muestras SB 2X, puede analizarse en estado reducido o no reducido. Para utilizar la cantidad adecuada de proteína se debe evaluar la sensibilidad del sistema de detección y heterogeneidad de la muestra. Para aplicar las muestras reducidas se debe colocar la mezcla durante 4-5 minutos en un baño de agua a ebullición. Para correr muestras no reducidas, se mezclan con amortiguador sin reductor (sin calentamiento) y se aplican al gel directamente. La concentración de las muestras a usar depende de su heterogeneidad.
- Cargar 5-15 μ l de volumen de las muestras en los pocillos (si son mezclas complejas 10-30 μ g o si son proteínas purificadas 3 - 10 μ g). Aplicar las muestras con una pipeta de puntas descartables, se puede verter previamente el buffer de electroforesis y luego cargar las muestras en los pocillos ya que son más densas por la glicerina que contiene el amortiguador SB 2X. Es importante evitar la contaminación cruzada entre los pocillos. Utilizar un marcador de peso molecular en el primer carril.
- Llenar la cámara con el buffer de electroforesis y correr las muestras a un voltaje constante (90 v) durante 3 horas o hasta que el azul de bromofenol llegue casi a la parte inferior del gel.
- Finalizado el periodo de corrida, fijar el gel durante 15 minutos para evitar los vapores tóxicos del metanol y para evitar que interfiera con la tinción lavar con agua destilada el SDS del gel.

- Realizar el teñido del gel durante 1 hora con azul de Coomasie.
- Decolorar el gel con varios cambios para eliminar el exceso de colorante.
- Para registrar los resultados se recomienda utilizar un sistema de registro fotográfico.
Para guardar los geles se puede dejar en cajas conteniendo ácido acético al 7% o en sellar con celofán.