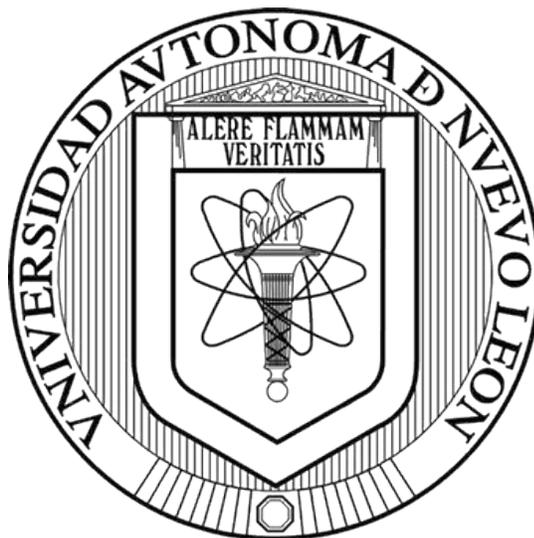


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**AISLAMIENTO DE CEPAS
DE *BACILLUS* PRODUCTORAS
DE PROTEASAS CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL**

POR

JULIAN ALBERTO JESUS ZARAGOZA CARMONA

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Microbiología Industrial**

San Nicolás de los Garza Nuevo León, Mayo de 2011

APROBACIÓN DE MAESTRIA

**AISLAMIENTO DE CEPAS DE BACILLUS PRODUCTORAS DE PROTEASAS
DE APLICACIÓN INDUSTRIAL**

Aprobación de la tesis:

Director de tesis
Director: Dra.

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

INDICE

Capítulo	Página
Resumen	v
1. Introducción	
1.1 Bacterias del Género <i>Bacillus</i>	1
1.2 Las Proteasas	3
1.3 Aplicación de proteasas en la industria de los detergentes	7
1.3.1 Aplicación de las proteasas en la industria del curtido de pieles.	13
1.3.2 Aplicación de las proteasas para la recuperación de plata de placas radiológicas.	15
1.4 Uso de proteasas en terapia médica.	16
1.4.1 Uso de proteasas en el tratamiento de desechos de la industria agropecuaria (avícola y ganadera).	17
2. Hipótesis y Justificación	
2.1 Hipótesis	20
2.2 Justificación	21
3. Objetivos	
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. Material y Métodos	
4.1 Recolección de muestras.	24
4.2 Aislamiento de las cepas de <i>Bacillus</i> .	24
4.3 Caracterización bioquímica de las cepas aisladas.	25
4.4 Conservación de las cepas aisladas.	26
4.5 Identificación de las cepas productoras de proteasas.	27
4.5.1 Activación de las cepas.	27
4.5.2 Obtención de los extractos proteolíticos.	28
4.5.3 Análisis de detección de actividad proteolítica.	28
4.6 Evaluación del efecto de pH y temperatura en la actividad proteolítica de las cepas seleccionadas.	29
4.7 Cinética de crecimiento de la cepa seleccionada.	29
4.8 Evaluación de la actividad proteolítica.	30
4.9 Ensayo de actividad hemolítica.	31

5. Resultados y Discusión	
5.1 Aislamiento de las cepas de <i>Bacillus</i>	32
5.2 Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas aisladas	33
5.3 Identificación de las cepas productoras de proteasas.	35
5.4 Evaluación del efecto del pH en la actividad proteolítica de las cepas aisladas.	37
5.4.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de las cepas aisladas.	40
5.5 Estudio del crecimiento de la cepa seleccionada de <i>Bacillus</i> sp.	43
5.6 Evaluación de la actividad proteolítica.	44
5.7 Ensayo de actividad hemolítica.	48
6. Conclusiones y Recomendaciones	
6.1 Conclusiones	52
6.2 Recomendaciones	53
Referencias	54

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Tipos de enzimas utilizadas en la industria de los detergentes	13

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
Fig. 1	Tipos de enzimas y porcentaje de aplicación industrial	4
Fig. 2	Eficacia de la proteasa alcalina de <i>B. subtilis</i> PE-11.	11
Fig. 3	Efecto de la proteasa de <i>Bacillus</i> FS-1 en el curtido de piel.	15
Fig. 4	Harina de plumas hidrolizadas.	18
Fig.5a,b	Morfología macroscópica de una cepa aislada.	32
Fig. 5c	Morfología macroscópica de una cepa aislada.	33
Fig. 6	Morfología microscópica de una de las cepas aisladas (Tinción Gram)	34
Fig. 7	Prueba de Amilasa	34
Fig. 8	Prueba de gelatinasa	34
Fig. 9	Detección de la actividad proteolítica de las cepas en estudio, mediante geles de poliacrilamida con gelatina.	36
Fig. 10	Detección de la actividad proteolítica de las cepas 9-17 en estudio, mediante geles de poliacrilamida con gelatina.	37
Fig. 11	Actividad proteolítica a pH 7 de las cepas aisladas.	39
Fig. 12	Actividad proteolítica a pH 10 de las cepas aisladas.	39
Fig. 13	Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 40°C	41
Fig. 14	Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 60°C	42
Fig. 15	Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 80°C	43
Fig. 16	Curva de crecimiento de la cepa 5304.	44
Fig. 17	Actividad proteolítica de la cepa 5304 a pH 8 y temperaturas entre 30°C y 60°C.	46
Fig. 18	Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa 5304.	47
Fig. 19	Muestras de sangre sin tratamiento a diferentes porcentajes de SDS a), c) y e). Muestras de sangre después del tratamiento con EP b), d) y f).	50
Fig. 20	Muestras de sangre sin tratamiento a diferentes porcentajes de SDS g) y i). Muestras de sangre después del tratamiento con EP h) y j).	51

RESUMEN

Julián Alberto Jesús Zaragoza Carmona Fecha de Graduación -----

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Bacillus* sp.
PRODUCTORAS DE PROTEASAS CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL

Número de Páginas: 58

**Candidato para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación
en Microbiología Industrial.**

Área de Estudio: Microbiología:

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas, representan uno de los tres grandes grupos de enzimas industriales y ocupan el 60% del mercado. Las proteasas alcalinas o subtilisinas, son un grupo fisiológica y comercialmente importante, utilizadas primordialmente como aditivos en detergentes, procesado de pieles, recuperación de plata en placas de rayos X, procesamiento de alimentos y tratamiento de aguas. El rango de pH para una actividad óptima es generalmente entre 9 y 11[2]. Las temperaturas óptimas van desde 50°C hasta 70°C. La masa molecular varía entre 15 a 30kDa[3]. Los objetivos de este proyecto fueron el de aislar cepas de *Bacillus* sp. productoras de proteasas; seleccionar las proteasas producidas de probable interés industrial en base al pH y temperatura óptimos con actividad, así como realizar una caracterización parcial de la enzima obtenida. Como producto de esta investigación, se aislaron 17 cepas del genero *Bacillus*, a partir de muestras de suelo agrícola, de las cuales el 80% presentaron actividad proteolítica. Las proteasas producidas por las cepas en estudio mostraron actividad en un rango de pH de 7 a 10 y en un rango de temperatura entre 30°C y 60°C. La cepa 5304 mostró una temperatura óptima de producción de enzima proteolítica, de 40°C. El pH óptimo para la producción de la proteasa estudiada, fue de 8. La proteasa producida por la cepa en estudio, mostró actividad hemolítica, con potencial uso en la industria de los detergentes debido a su compatibilidad y tolerancia a pH y temperatura.

Firma del Asesor: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias del Género *Bacillus*.

Las diferentes especies de *Bacillus* sintetizan y excretan una gran cantidad de enzimas proteolíticas durante su crecimiento y esporulación. La mayoría de las enzimas proteolíticas extracelulares del genero *Bacillus* son serinproteasas alcalinas como la subtilisina producida por *B. subtilis*, y metaloproteasas neutras como termolisina producida por *B. thermoproteolyticus* [1].

Los microorganismos del género *Bacillus* están clasificados como aerobios o anaerobios facultativos Gram positivos, formadores de endosporas, pertenecientes a la familia *Bacillaceae*, de acuerdo a los autores del manual de Bergey 2ª edición [2] . Estas bacterias tienen un contenido de G+C entre 39% y 69% dependiendo de la especie [3]. Las esporas pueden ser clasificadas de acuerdo a su localización en el bacilo: centrales, subterminales o terminales; las formas esporuladas pueden permanecer latentes durante tiempo prolongado,

hasta que las condiciones ambientales sean favorables para que puedan germinar de nuevo y reiniciar su actividad metabólica.

Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm de diámetro x 1,2-10 μm de longitud. Es un género que incluye más de 60 especies de bacilos por lo que la morfología de sus colonias es muy variada, pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; con bordes ondulados o extendidos en el medio, algunos con aspecto de vidrio esmerilado [4]. Su hábitat primario es el suelo y gracias a su potencial de producir endosporas, facilita la posibilidad de aislarlos y mantenerlos en cultivos en el laboratorio ya que resisten temperaturas en las que otras bacterias no sobreviven.

Son quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos, capaces de respirar utilizando compuestos orgánicos simples como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, en algunos casos fermentan carbohidratos produciendo glicerol y butanodiol. La mayoría de las especies de *Bacillus* son mesófilos, con la temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 45°C, pero algunos son termófilos con una temperatura óptima tan alta como 65°C. Otros son psicrófilos, capaces de crecer y esporular a los 0°C.

Se les llaman alcalófilos a aquellos organismos que viven en ambientes con pH encima de 9. Los alcalófilos necesitan aislar el interior de la célula del medio alcalino exterior ya que algunas moléculas, especialmente las hechas de RNA, se rompen a pH superior a 8. Las células de los alcalófilos se protegen con extremo enzimas que se localizan cerca de la pared celular o por medio de secreciones externas [5].

De todos los microorganismos alcalófilos que han sido estudiados para ser utilizados en aplicaciones industriales, los miembros del género *Bacillus* predominan como fuente productora de proteasas alcalinas [6].

1.2 Las proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Tienen un rol fisiológico e industrial, su rol fisiológico va desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos como coagulación de la sangre por medio de la trombina que es una serin proteasa, apoptosis constituida por caspasas (**cistein-aspartato proteasas**), activación de zimógenos ej. enzimas pancreáticas, por otra parte se utilizan en la industria de las pieles, detergentes y alimenticia entre otras. Están presentes en todos los organismos y constituyen del 1-5% del contenido del genoma [7]. Se encuentran naturalmente en organismos vivos, donde se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas.

Son producidas por hongos filamentosos y bacterias, las proteasas producidas por hongos tienen un pH óptimo dentro del rango ácido (pH 2-6) mientras que la mayoría de las proteasas de origen bacteriano tienen un pH óptimo alcalino (pH 8-11).

Las proteasas pueden romper ya sea enlaces peptídicos específicos, dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína, o pueden reducir un péptido completo a aminoácidos [8].

La industria de las enzimas tiene un valor a nivel mundial estimado en \$1 billón de dólares, del cual el 75% corresponde a enzimas hidrolíticas; las proteasas representan uno de los tres grupos de enzimas industriales y ocupan el 60% del mercado, como se puede observar en la figura 1.

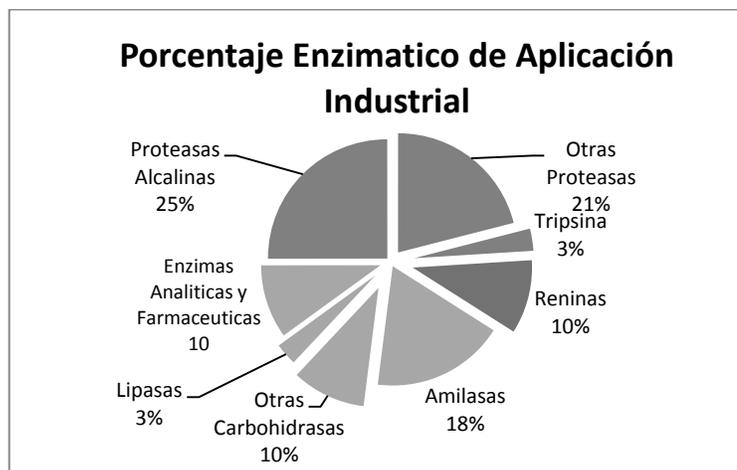


Fig.1 Tipos de enzimas y porcentaje de aplicación industrial [8].

De acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular las proteasas están clasificadas en el subgrupo 4 del grupo 3 que son las hidrolasas. Sin embargo, debido a su gran diversidad de acción y a su estructura están subdivididas en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo del sitio de acción. Las exopeptidasas rompen el péptido cerca de los grupos terminales del sustrato, mientras que las endopeptidasas lo hacen lejos de los grupos terminales [8]. A su vez, en base a sus grupos funcionales de acción son clasificadas en cuatro grupos; serinproteasas, proteasas aspárticas, cisteinproteasas y metaloproteasas.

Serin Proteasas: poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas (clasificadas como EC 3.4.21) incluye a la tripsina, quimotripsina, subtilisina entre otras.

Proteasas Aspárticas: se trata de enzimas bilobuladas donde el sitio activo está entre dos lóbulos homólogos. Cada lóbulo contribuye con un aspartato, el pH óptimo de actividad de la enzima es ácido para la mayoría de las aspártico proteasas, donde un protón está compartido por los dos aspartatos del sitio activo. Ejemplos: Familia de la Pepsina: catepsina D, renina.

Cistein Proteasas: la familia de las cisteína proteasas engloba a todas aquellas proteasas que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico. Los miembros de esta familia que desempeñan un papel importante en los procesos apoptóticos en el sistema nervioso son las caspasas y las calpaínas. Ejemplos: papaína, catepsinas lisosomales B, H y L.

Metaloproteasas: Tienen amplias diferencias en secuencias y estructura. La gran mayoría contienen Zn en sitio activo algunas Co. Ejemplos: Termolisina, metaloproteasas de la matriz extracelular

Existen más de 3000 enzimas de tipo proteasas descritas hasta la fecha, sin embargo la mayoría de éstas funcionan en un rango muy reducido de pH, temperatura y fuerza iónica. Además la aplicación tecnológica de las enzimas bajo las condiciones de la demanda industrial disminuyen el número de enzimas posibles de utilizar [9].

Entre las serinproteasas se encuentra un grupo de enzimas llamadas comúnmente proteasas alcalinas o subtilisinas que son un grupo fisiológica y comercialmente importante utilizadas primordialmente como aditivos en detergentes, el curtido de pieles, recuperación de plata en placas de rayos X, procesamiento de alimentos y tratamiento de aguas. Tienen un rol catalítico muy importante en la hidrólisis de proteínas.

El rango de pH óptimo es generalmente entre 9 y 11 [10]. Las temperaturas óptimas van desde 50°C hasta 70°C. La masa molecular varía entre 15 a 30kDa [11]. Requieren un ion divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) o una combinación de estos cationes para aumentar la actividad [10]. Las serinproteasas son inhibidas por fenil-metil-sulfunil-fluoruro (PSMF) diisopropilfluorofosfato (DFP) la enzima hidroliza el enlace entre el fósforo y el flúor, pero el residuo de fosfato se mantiene unido a una serina en el centro activo, inactivándolo, las metaloproteasas son inhibidas por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [12] cuando su ion de metal es atacado por el EDTA.

Tienen diversas aplicaciones industriales que se pueden dividir en: aditivos para detergentes, industria del curtido de pieles, recuperación de plata, uso farmacéutico, tratamientos de desechos de la industria avícola, industria alimenticia e industria química.

1.3 Aplicación de proteasas en la industria de los detergentes

Un detergente es una sustancia que tiene la propiedad química de disolver la suciedad o las impurezas de un objeto sin corroerlo, reduce la tensión superficial del agua, de manera que las moléculas de agua no se sienten tan atraídas mutuamente, y pueden penetrar mejor en la superficie a limpiar.

Las moléculas del detergente tienen un polo lipófilo, y un polo hidrófilo. La suciedad que está adherida a los tejidos mediante partículas oleosas atrae a los polos lipófilos, y los polos hidrófilos quedan dispuestos hacia fuera y rodeando la suciedad, de forma que el agua arrastra todo el conjunto [13].

Las temperaturas de lavado cada vez son menores, para proteger los tejidos y los colores, para ahorrar energía y proteger el ambiente. Por este motivo durante las últimas décadas los fabricantes de detergentes se han visto forzados a modificar severamente la composición de sus productos. Han respondido a estos cambios añadiendo a sus productos enzimas (mejores a las actuales), agentes oxidantes y fosfatos para el blanqueado [14].

Los componentes principales de los detergentes actuales son los siguientes.

Tensoactivos o surfactantes, son las sustancias detergentes propiamente dichas.

Según las propiedades químicas, se clasifican en: a) aniónicos (-): son soluciones de pH ácido y pueden reaccionar con agroquímicos catiónicos (+) precipitándose, b) catiónicos (+): son soluciones de pH ácido y pueden reaccionar con agroquímicos catiónicos precipitándose, c) no iónicos: son soluciones de pH ácido y pueden reaccionar con agroquímicos catiónicos precipitándose y d) anfóteros: los surfactantes anfóteros tienen dos grupos funcionales: uno aniónico y otro catiónico. Según el pH una de las dos disociaciones domina (aniónico a alto pH, catiónico a bajo pH) cada tipo tiene propiedades limpiadoras diferentes.

Potenciadores o constructores: retienen el calcio y el magnesio que pueda haber en el agua, y evitan que la suciedad se vuelva a depositar en el tejido.

Enzimas: rompen las moléculas de las manchas proteínicas (huevo, leche, sangre), para que el agua se las pueda llevar.

Blanqueadores: dejan la ropa más blanca y eliminan las manchas más difíciles.

Abrillantadores Ópticos: son sustancias fluorescentes que permanecen en la ropa después del proceso de blanqueado. Reflejan los rayos ultravioletas del sol, de manera que la ropa parece más blanca de lo que es dándole un tono azulado o verdoso, según la marca. En la ropa de color, los colores quedan más vivos.

Perfumes: dan olor a la ropa.

Relleno: no tiene ninguna función limpiadora, sólo se pone para aumentar el volumen del detergente. Dependiendo de la fórmula, puede representar desde un 5% hasta un 45% del total de materia. Los detergentes concentrados no lo contienen.

Aplicación de proteasas como aditivos para Detergentes

Las proteasas alcalinas microbianas dominan el mercado de las enzimas en la industria de los detergentes. Estas proteasas añadidas a los detergentes ayudan a la liberación de material proteico de las manchas. Además permiten temperaturas de lavado menores y períodos cortos de agitación, después del periodo de enjuagado [15].

Idealmente las proteasas y otras enzimas usadas en detergentes deben tener alta actividad y estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura. Estas enzimas deben ser efectivas a bajos niveles de concentración en el detergente (0.04%-0.08%) y ser compatibles con la mayoría de los compuestos en los detergentes como los agentes oxidantes y secuestrantes iónicos [16,17]. También deben tener una buena vida de anaquel; es decir que tengan actividad aún pasado un tiempo de almacenamiento prolongado.

Una proteasa con posible uso como aditivo para detergentes proveniente de *Bacillus circulans* encontrada por Venugopal en el 2007, mostro estabilidad ante la presencia de SDS, Triton X-100 y H₂O₂ [18], sin embargo presentó un rango de temperatura reducido (35-55°C), con un óptimo de actividad enzimática de 40°C y estabilidad de la enzima hasta los 55°C.

Adinarayana y col. en el 2003 obtuvieron una proteasa compatible con algunos detergentes que aumentaba la capacidad de remoción de manchas de sangre de los textiles, su peso molecular fue de 15kD, con una temperatura óptima de 60°C y un pH óptimo de 10; esta enzima presentó una estabilidad alrededor del 100% a 60°C, hasta por 350 minutos de incubación, era activada altamente por metales como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} [19]. La figura 2 muestra la eficacia de esta proteasa que en conjunto con un detergente comercial eliminaron completamente las manchas de sangre.

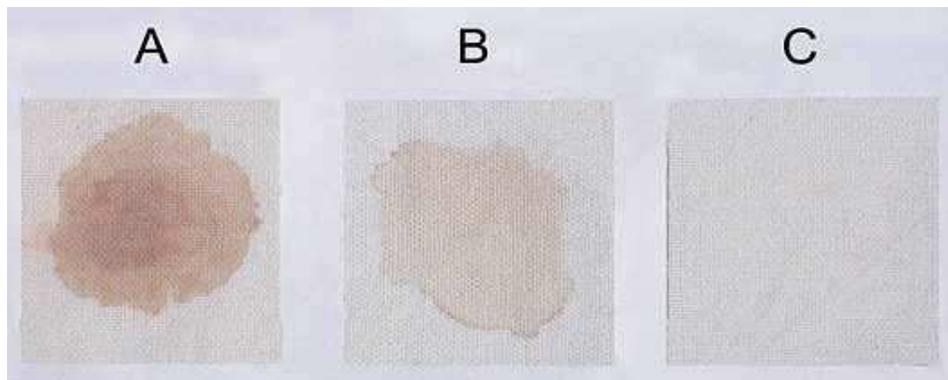


Fig. 2. Eficacia en lavado de la proteasa alcalina de *B. subtilis* PE-11 en presencia del detergente (Wheel)®. (A) tela manchada de sangre; (B) tela manchada de sangre tratada con detergente sólo, y (C) tela manchada de sangre tratada con detergente y enzimas [19].

Otra aplicación es en las soluciones para limpiar los lentes de contacto, aunque la estabilidad necesaria para lograr un buen desempeño de estas soluciones no es la misma que la requerida en un detergente para lavado de ropa. Esto se debe a que la temperatura a la que se empleara no es mayor a 40°C, ni es necesario que permanezcan activas en presencia de tensoactivos, pH 9 o superior [9].

Recientemente se ha incrementado el interés en el uso de proteasas alcalinas en detergentes para utensilios de comida; como cocteles de proteasas y lipasas que ayuden a degradar y solubilizar las proteínas [9].

Nadeem y colaboradores reportaron en el 2007 haber obtenido una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* aislado de suelo, la cual tenía una temperatura de actividad óptima de 60°C y presentaba un pH óptimo de 11, siendo una opción viable para el uso en detergentes gracias al pH óptimo [8].

Las características necesarias para que una enzima sea utilizable en la industria de los detergentes son: pH alcalino, estable a diferentes temperaturas y que sea compatible con detergentes comerciales.

Actualmente el mercado de las proteasas se aplica a diferentes detergentes y entre las principales especies del género *Bacillus* productoras de estas enzimas que actualmente se comercializan están *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. alkalophilus*. (Tabla 1) [20].

Tabla 1. Tipos de enzimas utilizadas en la industria de los detergentes [20].

Marca registrada	Productor	Origen	IP/N *	Cepa productora	Sinónimo
Alcalasa	Novozymes	B. licheniformis	N	B. licheniformis	Subtilisina Carlsberg
FNA	Genencor	B. amyloliquefaciens	IP	B. subtilis	
Savinase	Novozymes	B. clausii	N	B. clausii	Subtilisina 309
Purafect	Genencor	B. lentus	N	B. subtilis	
Kap	Kao	B. alkalophilus	N	B. alkalophilus	
Everlase	Novozymes	B. clausii	IP	B. clausii	
Purefact OXP	Genencor	B. lentus	IP	B. subtilis	
FN4	Genencor	B. lentus	IP	B. subtilis	
BLAP S	Henkel	B. lentus	IP	B. licheniformis	
BLAP X	Henkel	B. lentus	IP	B. licheniformis	
Eperase	Novozymes	B. halodurans	N	B. halodurans	Subtilisina 147
Kannase	Novozymes	B. clausii	IP	B. clausii	
Properase	Genencor	B. alkalophilus PB92	IP	B. alkalophilus	

1.3.1 Aplicación de las proteasas en la industria del curtido de pieles.

La preparación de las pieles comienza curándolas con sal. Esto puede hacerse con sal húmeda, salando fuertemente las pieles y prensándolas en paquetes durante unos 30 días, o bien con salmuera, agitando las pieles en un baño salado durante unas 16 horas. Las pieles se mojan luego en agua limpia para eliminar la sal y en una solución de cal y agua para ablandar el pelo. La mayoría del pelo se elimina entonces usando una máquina y quitando los restos a mano con un cuchillo romo, proceso conocido como labrado. Dependiendo del uso que vaya a darse al cuero, las pieles pueden tratarse con enzimas para ablandarlas.

Las proteasas alcalinas tienen capacidad de degradar la elastina y queratina, ofrecen un efectivo biotratamiento del cuero, especialmente en el depilado y baño de piel para la remoción completa del pelaje [21,22].

Las condiciones alcalinas promueven la inflamación de las raíces del pelo permitiendo su fácil extracción por el ataque subsecuente de las proteasas sobre la proteína del folículo.

Zambare y col. en el 2007 obtuvieron de una cepa de *Bacillus cereus* una proteasa de uso potencial para la degradación de pelo animal la cual dejaba completamente vacíos los folículos teniendo una remoción completa del pelo de búfalo en este caso, sin embargo la enzima era estable solo hasta 35°C [23].

A pesar de las fuertes condiciones alcalinas de este proceso, es menos agresivo aparte de ser más seguro que los métodos tradicionales en los que se usan sulfuro de sodio y otros ácidos orgánicos, que contaminan los efluentes de la industria, produciendo un alza considerable en el pH del agua así como efectos tóxicos para la salud. Ya que el cuero queda prácticamente intacto y aumenta su valor comercial [9].

El baño seguido del proceso de depilado involucra la degradación de elastina y queratina, provocando la remoción de pelo y el desdoblamiento del colágeno lográndose la obtención de un cuero suave de buena calidad utilizado principalmente en la confección de prendas de vestir [24].

En el 2007 Sharmin y Rahman obtuvieron una metaloproteasa de una cepa de *Bacillus*, la cual tenía un pH y temperatura óptimos de actividad de 8.5 y 60°C respectivamente, esta proteasa tiene gran potencial en la remoción de pelo. Como se puede observar en la fig.3 [25].

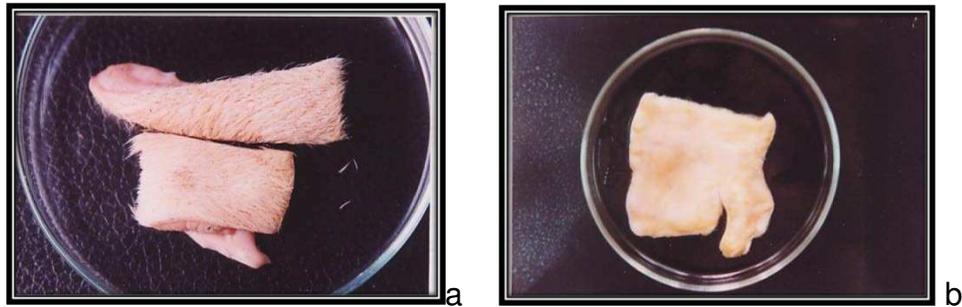


Fig.3 Efecto de la proteasa en el curtido de piel a) Piel sin tratamiento enzimático, b) Piel con tratamiento enzimático.

1.3.2 Aplicación de las proteasas para la recuperación de plata de placas radiológicas.

Las proteasas alcalinas son utilizadas en el bioprocesamiento de las placas de rayos X para la recuperación de plata. Estas placas contienen aproximadamente el 1.5 a 2% (en peso) de plata en sus capas de gelatina. La práctica convencional de la recuperación de plata al quemar las placas causa

un problema de contaminación ambiental. La hidrólisis enzimática de las capas de gelatina permite la recuperación de la plata así como el reciclado de la base de poliéster de la placa [26].

Fujiwara y col. en el 1991 encontraron que las enzimas producidas por las cepas de *Bacillus* B21-2 y *Bacillus* sp. B18 cepas descubiertas en los años 1989 y 1991 respectivamente, eran capaces de degradar la capa de gelatina presentes en las placas de rayos X a un pH de 10 en un tiempo de 2 min con una concentración de enzima de 1000 U/ml [26][27].

Por otra parte Gajiu reportó en 1996 una proteasa producida por *B. coagulans* PB-77 con un pH óptimo de 9 utilizada en la recuperación de la plata una vez hidrolizada la placa de rayos X [28].

1.4 Uso de las proteasas en terapia médica

La elastasa es una proteasa con alta actividad proteolítica que se obtiene a partir de *Bacillus subtilis* 316M. Esta enzima fue inmovilizada en una venda para su uso terapéutico en el tratamiento de quemaduras, heridas purulentas, carbuncos y abscesos profundos [9].

Kim y col. en el 1996 reportaron una proteasa con actividad fibrinolítica ha sido usada como agente trombolítico, y puede ser administrada por vía oral [29].

1.4.1 Uso de las proteasas en el tratamiento de desechos de la industria agropecuaria (avícola y ganadera).

Las proteasas alcalinas son utilizadas para la hidrólisis de desechos de los procesos de la industria avícola y ganadera, así como desechos de actividades del hogar por su capacidad para degradar cabello y grasas.

Las plumas constituyen aproximadamente el 5% del peso corporal de las aves de corral y se pueden considerar una fuente de alto valor proteico para la alimentación animal, siempre que su estructura rígida de queratina sea completamente destruida.

Se han reportado enzimas de *Bacillus subtilis* utilizables en el procesamiento de las plumas desechadas en los mataderos de aves de corral [31]. El tratamiento previo con NaOH, la desintegración mecánica y la hidrólisis con este tipo de enzimas dan lugar a la solubilización total de proteínas. El producto final es un polvo pesado, grisáceo, con un alto contenido de proteína [32](fig.4).



Fig.4 Harina de Plumas Hidrolizadas [33].

En el 2008 Ghosh y col. encontraron una proteasa de *Bacillus cereus*, con actividad para degradar queratina utilizable en el tratamiento de las plumas de aves con su posterior aplicación de los productos degradados para la elaboración de forraje [34].

Del mismo modo muchas otras proteasas alcalinas son usadas actualmente en la tecnología de procesamiento de forrajes, para la alimentación de ganado, productos cosméticos, para eliminar el vello de las tuberías de las bañeras que causan malos olores en las casas y para degradar materiales de queratina en basura doméstica [35].

Dias y col. en el 2008 reportaron el uso de suero de queso en un medio de cultivo como inductor para la producción de proteasa de *Bacillus*. Este suero de queso proviene como desecho de la industria alimenticia por lo que resulta un medio sumamente barato y de alto rendimiento para la producción de proteasa además proporciona un área de oportunidad en la investigación como un nuevo

método para investigación en la optimización del crecimiento de especies de *Bacillus* y la producción de enzima [36].

Wan y colaboradores en el 2008 hicieron un estudio sobre una proteasa con posibilidad de uso en la remoción de pelo, probaron diferentes proteínas y evaluando la capacidad de ésta encontraron que la termoestabilidad dependía esencialmente de los iones metálicos y de Ca^{+2} específicamente. Los iones ayudan a mantener la estabilidad de la proteasa por un tiempo mayor al habitual, para un funcionamiento prolongado a una temperatura superior a la óptima [37].

Manachini y Fortina en 1998 encontraron que al preparar el medio de fermentación para evaluar la actividad enzimática, incorporando agua de mar en su composición se observaba un incremento en la actividad proteolítica de hasta un 150% con respecto al medio de fermentación que utilizaba agua destilada. Esta proteasa era producida por una cepa de *B. licheniformis* con pH y temperatura óptimos de 9 y 70°C respectivamente [38].

Zaliha y colaboradores en el 2007 estudiaron 5 cepas de *Bacillus pumilus* tolerantes a solventes orgánicos, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX) y encontraron que la proteasa más resistente soporto hasta un 25% v/v de benceno y tolueno, hasta la fecha es el único reporte que se tiene sobre una proteasa tolerante a solventes orgánicos de *B. pumilus* [39].

CAPITULO 2

HIPÓTESIS y JUSTIFICACIÓN

2.1 Hipótesis

Las cepas de *Bacillus* sp. aisladas de suelo producen proteasas de interés industrial con características de actividad para ser aplicadas en la industria de los detergentes.

2.2 Justificación

La demanda de productos amigables con el ambiente y que cumplan los estrictos requerimientos de diversos procesos, como los de lavado, ha llevado a muchos investigadores a dedicar tiempo y recursos en la búsqueda de enzimas proteolíticas que satisfagan tanto las necesidades del mercado de los detergentes como que se den cumplimiento a las diferentes normas ambientales.

Las proteasas producidas por *Bacillus* han demostrado ser, desde hace años una herramienta biotecnológica útil, no solo para mejorar la eficacia de los detergentes, sino también han sido utilizadas ampliamente en otro tipo de industrias, alcanzando y/o superando los métodos tradicionales.

Por lo anterior, existe una necesidad de enzimas nuevas con propiedades de tolerancia mayores a las actuales que se puedan acoplar a las condiciones extremas de los procesos industriales.

Por esto se deben de estudiar nuevas especies del genero *Bacillus* productoras de proteasas para una evaluación de estas y compararlas con las enzimas utilizadas hasta ahora, la demanda tan grande de las industrias (detergentes, textil, médica) hace que sea económicamente atractivo el uso de proteasas con mejor estabilidad que las actuales.

La búsqueda de enzimas que puedan ser activas en un amplio rango tanto de pH como de temperatura sigue siendo un área importante de investigación, para la solución a estos problemas que se presentan en la industria de los detergentes principalmente.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Aislar una cepa del genero *Bacillus* y estudiar una proteasa proveniente de esta.

3.2 Objetivos Específicos

1. Aislar cepas de *Bacillus sp.* productoras de proteasas.
2. Seleccionar las cepas de *Bacillus* con mayor capacidad productora de proteasas.
3. Determinar el pH y temperatura de actividad óptimo de las proteasas en estudio.
4. Realizar un estudio del efecto del SDS en la actividad enzimática de las proteasas en estudio.

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolección de muestras.

Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se procedió a tomar 3 muestras de suelo de un área agrícola, para lo cual se limpió el área superficial y se procedió a coleccionar 250 g de suelo aproximadamente y se colocaron en una bolsa de plástico, se sellaron y etiquetaron para posteriormente ser trasladadas al laboratorio para su procesamiento. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (22°C) y utilizadas para la búsqueda de las cepas de *Bacillus*.

4.2 Aislamiento de las cepas de *Bacillus*.

Aislamiento de las cepas bacterianas productoras de proteasas.

Bajo condiciones de esterilidad se pesaron 2g de suelo y con ayuda de una espátula de acero inoxidable fueron colocados en un tubo de ensayo que contenía 10 mL. de medio de cultivo infusión cerebro corazón (ICC) previamente esterilizado. Posteriormente, los tubos fueron colocados en baño de agua a 80°C por 15 minutos para eliminar bacterias y facilitar el aislamiento

del género *Bacillus*. Inmediatamente después se tomó 1 mL del sobrenadante de la dilución y se inoculó en placas de Agar ICC bajo condiciones de asepsia, por el método de dispersión utilizando una espátula de Dryglasky.

Las placas se incubaron por 48 h a 37°C; transcurrido este tiempo se observaron las características de las colonias obtenidas, y de aquellas que presentaron morfología propia del género *Bacillus*, se realizó tinción Gram para observar sus características. De las colonias que presentaron características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas de *Bacillus*, se procedió a realizar una transferencia a placas Petri que contenían 15 mL de Agar ICC realizando siembras por estría cruzada para la obtención de cultivos puros.

Se realizaron subcultivos en tubos con agar ICC inclinado en tanto se lograba su caracterización bioquímica.

4.3 Caracterización Bioquímica de las cepas aisladas.

A cada uno de los cultivos puros obtenidos, se les realizó la tinción Gram, así como las pruebas bioquímicas de producción de amilasa y gelatinasa, reportadas como positivas para bacterias del género *Bacillus* en el manual Bergey 2ª edición.

Para llevar a cabo la prueba de la gelatinasa, se prepararon tubos conteniendo 5mL de gelatina nutritiva. Los tubos se inocularon por punción y posteriormente se incubaron a 37°C por 48 h. Después se colocaron a 4°C por 30 min. para verificar presencia o no de licuefacción de la gelatina.

La evaluación de la producción de amilasa, es una prueba característica, la cual viene referenciada en el manual Bergey's para la identificación de microorganismos del género *Bacillus*. Para determinar si el microorganismo produce esta enzima, se inoculó por estría en una placa conteniendo agar almidón, y después de 48 h de incubación a 37°C se adicionaron 5 mL de yodo, para determinar la presencia del complejo almidón-yodo, al visualizar una coloración morada revela la ausencia de la enzima amilasa, mientras donde no hay coloración existe la presencia de la enzima amilasa.

4.4 Conservación de las cepas aisladas.

Los cultivos aislados que presentaron las características tanto morfológicas como bioquímicas correspondientes al género *Bacillus* se transfirieron a medio líquido de ICC y se incubaron a 37°C por 48 h. Posteriormente se tomó 1 mL del cultivo líquido de cada una de las cepas obtenidas y se colocó en tubos de ensaye conteniendo 1mL de glicerol al 30% para su almacenamiento y conservación a -20°C, hasta sus posteriores análisis.

4.5 Identificación de las cepas productoras de proteasas.

Para determinar si las cepas aisladas, tenían la capacidad de producir proteasas, después de su activación, se cultivaron en medio líquido para la obtención de un extracto del cultivo y examinar la presencia o no de actividad proteolítica, en dicho extracto.

Finalmente, de las cepas que demostraron producir enzimas proteolíticas, se seleccionó una, con la finalidad de realizar los ensayos correspondientes a evaluación del efecto de pH y temperatura sobre su actividad enzimática. Lo anterior, debido a que el objetivo del presente estudio fue encontrar una cepa productora de enzimas de importancia en la industria de los detergentes.

4.5.1. Activación de las cepas

Para su activación, las cepas se descongelaron, dejándolas a temperatura ambiente (22°C) por 24 h, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL del medio de cultivo soya tripticaseína y se incubaron por 24 h a 37°C, con agitación a una velocidad de 150 rpm.

4.5.2 Obtención de los extractos proteolíticos (EP).

Una vez que se logró la activación de cada una de las 17 cepas aisladas, se transfirieron 2.5 mL del cultivo de activación a otro matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 225 mL de caldo soya tripticaseina y se llevó a incubar por 48 h a 37°C con agitación, a una velocidad de 150 rpm.

Al término de la fermentación se tomaron, bajo condiciones de esterilidad, 20 mL de cada matraz, y se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min. El sobrenadante (extracto proteolítico) fue utilizado para el análisis de detección de actividad proteolítica.

4.5.3 Análisis de detección de actividad proteolítica.

Para determinar la presencia de actividad proteolítica de las cepas aisladas, se realizaron análisis de los extractos proteolíticos (EP), de las cepas en estudio, utilizando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, evaluando todas las cepas aisladas a pH7 y 22°C, para lo cual se procedió a colocar 5µL de cada uno de los extractos en geles de poliacrilamida SDS-PAGE con una concentración de 10% de poliacrilamida y 1% de gelatina. Después de terminada la electroforesis, se realizaron tres lavados al gel, dos con Triton X-100 al 1%, por 30 min. y el tercero con el buffer respectivo del pH de prueba (pH 10) por un tiempo de 60 min. a la temperatura de prueba (22°C, 40°C, 60°C u 80°C), respectivamente para la eliminación del SDS.

El fundamento de dicha técnica, se basa en la capacidad de la gelatina de copolimerizarse con la acrilamida, formando un gel el cual posteriormente se tiñe de azul al agregar azul de Coomassie. Las proteasas presentes en el extracto, al pasar por el gel hidrolizaran la gelatina rompiendo el copolímero y evitando la tinción en la región hidrolizada, en base a la presencia y cantidad de proteasa presente en el EP analizado será el número y ancho de bandas.

Las cepas seleccionadas para los estudios posteriores, fueron las que presentaron mayor número e intensidad de bandas proteolíticas.

4.6 Evaluación del efecto del pH y temperatura en la actividad proteolítica de las cepas seleccionadas.

Para conocer el efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de las cepas que presentaron el mayor número y/o intensidad de bandas en los geles correspondientes al ensayo de actividad proteolítica, se procedió a realizar los análisis de los extractos proteolíticos (EP) de éstas, siguiendo la metodología descrita previamente.

4.7 Cinética de crecimiento de la cepa seleccionada

Se realizó una curva de crecimiento de la cepa seleccionada, cultivándola en matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo nutritivo, a 37°C y 150 rpm tomando muestra cada 2h durante las primeras 12 h, y cada 6 h hasta el término de la incubación, midiendo absorbancia a una λ de 600 nm.

4.8 Evaluación de la Actividad Proteolítica

Para medir la actividad proteolítica de las cepas seleccionadas se utilizó el protocolo de Sigma modificado en lo que se refiere a volumen usado. Dicho método consiste en utilizar caseína como sustrato para la enzima, que será hidrolizada por la proteasa para después ser cuantificada por análisis colorimétrico con el reactivo Folin & Ciocalteu, y se procedió como se describe a continuación.

Del cultivo de fermentación de la cepa seleccionada, previamente centrifugado a 3500 rpm por 15 min., se tomó 1 mL del sobrenadante y se añadió Buffer de fosfatos 50 mM con caseína como sustrato 0.65%, se mezcló con ayuda de un vortex. Se utilizaron soluciones buffer 50 mM a pH 8, éstos tubos fueron incubados a diferentes temperaturas a 30°C, 40°C, 50°C y 60°C. Para detener la reacción de la hidrólisis de la caseína se añadieron 2 mL de ácido tricloroacético 110 mM y posteriormente se incubaron a 37°C por 30 min.

Finalizado el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 20 min. para precipitar caseína no hidrolizada, posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensaye el cual contenía 2 mL de NaCO₃ 500 mM, inmediatamente después se agregó reactivo Folin & Ciocalteu 1:5 v/v, los tubos fueron agitados manualmente y posteriormente fueron incubados a 37°C por 30 min. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Al término de la incubación se procedió a leer a una longitud de onda de 660nm. La actividad enzimática fue reportada como unidades de proteasa/ml donde una unidad de proteasa es definida como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 mmol de tirosina por mL por minuto bajo las condiciones estándar del ensayo.

Previamente se realizó una curva estándar del ensayo de acuerdo al protocolo de Sigma [40]

4.9 Ensayo de Actividad Hemolítica

Para esta determinación, se seleccionó la cepa 5304. Para conocer la capacidad hemolítica de la proteasa en estudio se evaluó su potencial como aditivo de detergente iónico (SDS) y la capacidad de remoción de sangre impregnada en trozos de tela de algodón. Para lo cual se cortaron 11 pedazos de tela 100% de algodón de 4x4cm. Se depositaron 100 µL de sangre fresca humana en el centro y se dejó secar a temperatura ambiente por 4hr.

Posteriormente se colocó cada trozo en una caja Petri, conteniendo 15mL del detergente SDS a diferentes concentraciones 1%, 5%, 10%, 15% y 20%. Después se agregaron 2 mL del EP de la cepa 5304 y se incubó a 40°C por 24h para después lavarse con H₂O corriente por 2min y se procedió a realizar observaciones.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de cepas de *Bacillus* sp.

Se lograron aislar 17 cepas de *Bacillus* sp. que mostraron una morfología macroscópica propia de lo reportado para el género. Se pudieron observar colonias medianas y grandes, de color crema, borde irregular, aspecto ceroso. En la figura 5 (a,b y c) se observa la morfología de cultivos puros crecidos en agar ICC a 37°C después de 48hr de incubación.



Fig. 5(a) Morfología macroscópica de una de una cepa aislada.



Fig. 5(b) Morfología macroscópica de una cepa aislada.



Fig. 5(c) Morfología macroscópica de una cepa aislada.

Dicha morfología es semejante a la reportada por [4][7][9] para cepas de *Bacillus*.

5.2 Caracterización Morfológica y Bioquímica de las cepas aisladas.

Se analizaron las características morfológicas y tintoriales de las cepas aisladas. Todas las cepas aisladas fueron analizadas bioquímicamente para la identificación del género y se confirmó que las 17 cepas corresponden a bacilos Gram (+) como se muestra en la Fig.6. Todas las cepas resultaron amilasa positivos, (el medio teñido con Lugol queda de color morado, al haber hidrolisis del almidón dejara un halo claro alrededor de donde este sembrada nuestra cepa) Fig.7. Gelatinasa positivos, (sembradas las cepas en tubos con agar gelatina, si existe licuefacción después de refrigerar el tubo con la bacteria en previo crecimiento este será positivo) Fig.8. Formadores de esporas.



Figura 6. Morfología microscópica de una de las cepas aisladas (Tinción Gram).



Fig. 7. Cepa 4201 en Agar Almidon después de 24hr a 37°C impregnada con sol. de Lugol f



Fig.8. Prueba de Gelatinasa

5.3 Identificación de las cepas productoras de proteasas.

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida es una herramienta útil para el análisis de la actividad proteolítica y la identificación de cepas productoras de enzimas con esta propiedad. En los geles se pudieron apreciar diversas características de las enzimas proteolíticas de las cepas aisladas, como tamaño, intensidad y ubicación de las bandas.

La mayoría de las cepas aisladas mostraron actividad proteolítica como se esperaba, debido a que existe gran cantidad de reportes correspondientes a proteasas del género *Bacillus*. Como se puede apreciar en las Fig. 9 y 10 la presencia de enzimas proteolíticas se manifiesta como bandas transparentes en el gel, debido a la hidrólisis de la gelatina con la que está copolimerizada y que, una vez teñido, las partes que carezcan de hidrólisis por las enzimas permanecerán azules.

En la figura 9 se observa que las enzimas de los carriles 3 y 7 presentan bandas de mayor grosor en comparación del resto lo que indica mayor producción de enzima por esa cepa. Mientras que en el carril 6 y 8 se aprecian gran número de bandas a diferentes alturas del gel, lo que indica enzimas de diferente peso molecular.

Las cepas 6302, 5203, 4204, 6306 y 4301 no presentaron actividad proteolítica enzimática (Fig.10). La cepa 4201 presento enzimas con actividad proteolítica.

Del total de cepas aisladas, 12 mostraron actividad proteolítica a pH 7 y 23°C

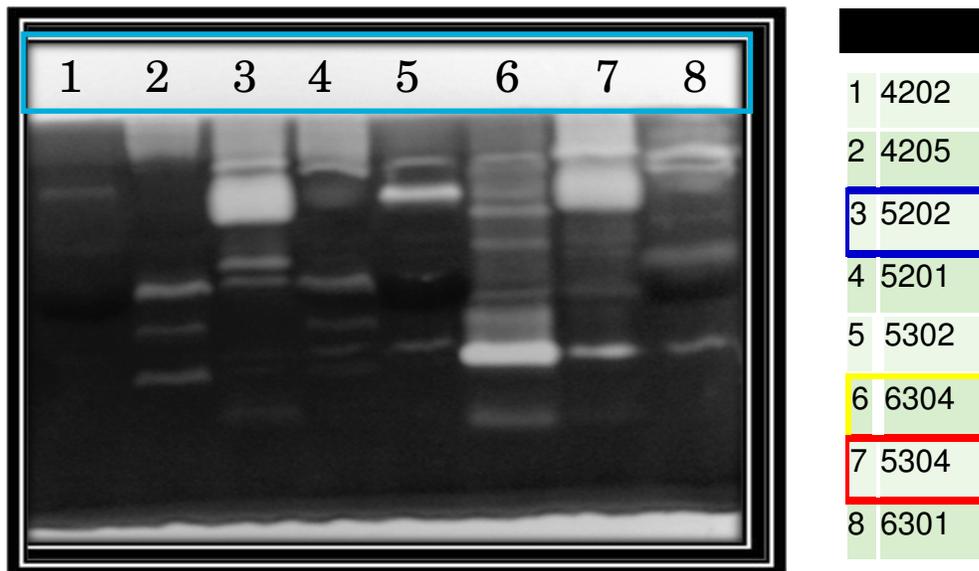


Fig. 9 Detección de la actividad proteolítica de las cepas en estudio, mediante geles de poliacrilamida con gelatina.

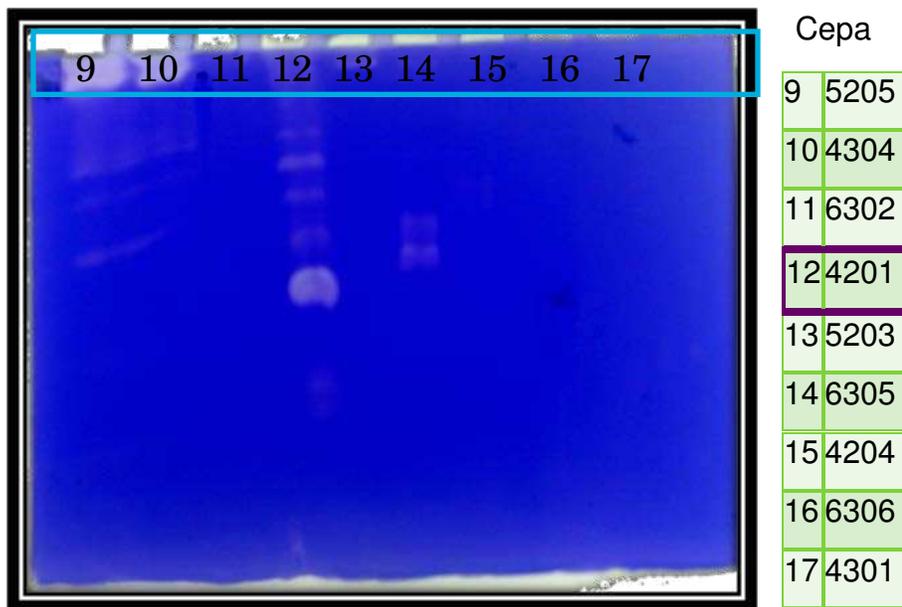


Fig. 10. Detección de la actividad proteolítica de las cepas en estudio, mediante geles de poliacrilamida con gelatina.

5.4 Evaluación del efecto del pH en la actividad de proteasas de las cepas aisladas.

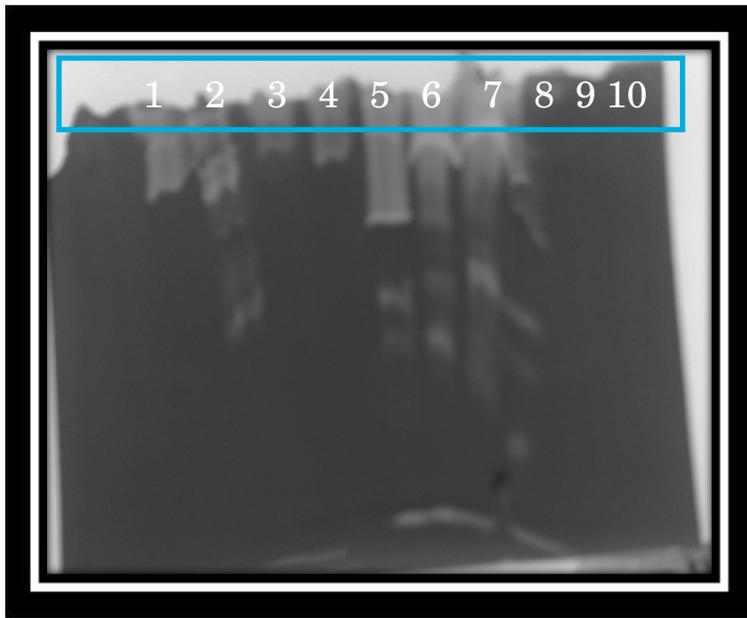
Para conocer el efecto del pH, en las actividades de las enzimas producidas por las cepas, se seleccionaron de las 17 en base a la cantidad y calidad de las bandas presentadas previamente en los ensayos de detección de actividad enzimática las cepas (5203, 6301, 4202, 4205, 4201, 5202, 5304 y 6304).

Se observó que las cepas 5304, 4201 y 6304 fueron las que presentaron mayor actividad a pH 7 (temperatura ambiente) (Fig. 11), debido a la presencia de mayor número de bandas transparentes en el gel.

En la figura 12 se puede apreciar que estas mismas cepas, después de probar los extractos proteolíticos de las 8 cepas previamente seleccionadas a pH 10 y 23°C, se observó que las cepas con mayor actividad a pH 7 fueron las que presentaron la mayor actividad a pH 10. Podemos deducir que las proteasas son alcalinas ya que su actividad se ve reflejada en la intensidad de la banda transparente y esta es mayor a pH 10 (Fig.12).

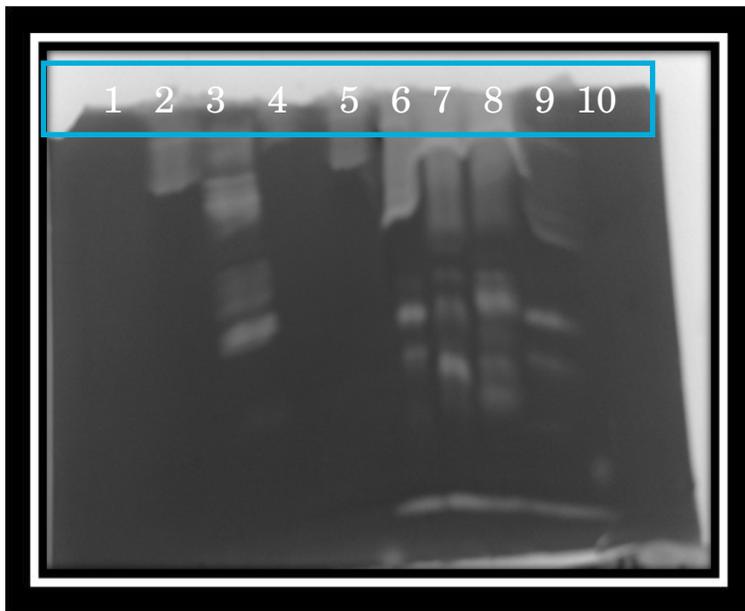
Debido a que se encontró mayor actividad proteolítica a pH 10, se evaluó el efecto de tres temperaturas (40°C, 60°C y 80°C) en las actividades proteolíticas de las 6 cepas seleccionadas, a este pH. Se seleccionaron 6 cepas la 6301, 5304, 4201, 6304, 5202 y 5203.

En la industria el uso de proteasas que soporten altos valores de pH es muy importante ya que la mayoría de los procesos de limpieza son a condiciones extremas, por lo que se requieren enzimas que presenten buena actividad a estos pH así como un tiempo de vida lo suficientemente prolongado para disminuir la cantidad de proteasa utilizada [42].



1	vacio
2	5203
3	6301
4	4202
5	4205
6	4201
7	5202
8	5304
9	6304
10	vacio

Fig. 11 Actividad proteolítica a pH 7, T 23°C de las cepas aisladas.



1	vacio
2	5203
3	6301
4	4202
5	4205
6	4201
7	5202
8	5304
9	6304
10	vacio

Fig. 12 Actividad proteolítica a pH 10, T 23°C de las cepas aisladas.

5.4.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la actividad de proteasas de las cepas aisladas.

Se seleccionaron las cepas que presentaron mayor actividad en pH 10 para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad de las proteasas.

En la figura 13 se observaron las bandas de las cepas que mostraron actividad a 40°C, fueron las correspondientes a los carriles 1, 2, 4 y 5, es decir la 6301, la 5304, la 4201 y la 6304. Siendo la cepa 5202 la de menor actividad. Mientras que en el carril 6, correspondiente a la cepa 5203 no se apreció actividad proteolítica.

La temperatura es un factor importante que afecta la actividad de las proteasas, debido a que provoca hidrólisis en los enlaces y la consecuente desnaturalización de la proteína. Se han reportado cepas de *Bacillus* resistentes a 40°C y 60°C en pH10, [20, 44]

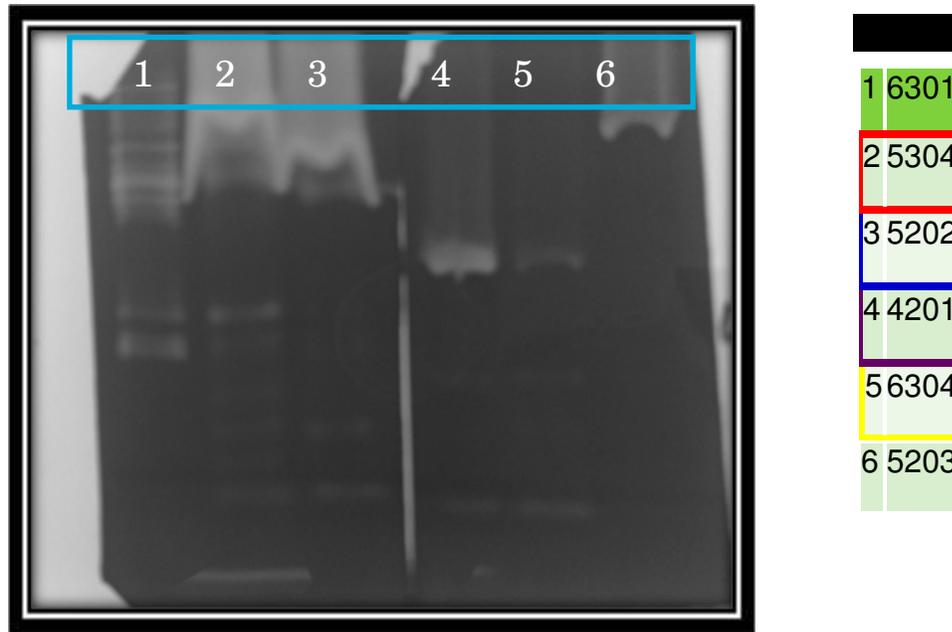


Fig. 13.- Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 40°C

En la prueba realizada a 40°C, se encontró que las cepas en estudio mostraron diferentes grados de resistencia, siendo las cepas 5304 y 5302, las que mostraron mayor actividad, seguidas por la 6301, 4201 y 6304, respectivamente. La cepa 5203 fue la más afectada por esta temperatura.

A temperatura de 60°C (fig.14) la cepa 5304 presenta un mayor número de bandas a comparación de las demás cepas, la cepa 5202 presenta el segundo mayor número de bandas sin embargo no son de intensidad fuerte por lo que a esta temperatura se ve afectada la actividad de la enzima de esta cepa. La cepa 6304 presenta al igual que la 5202 una baja intensidad en la actividad pero con un número menor de bandas proteolíticas. La cepa 4201 presenta un patrón de bandas similar al de la cepa 6304 con un poco de mejor actividad.

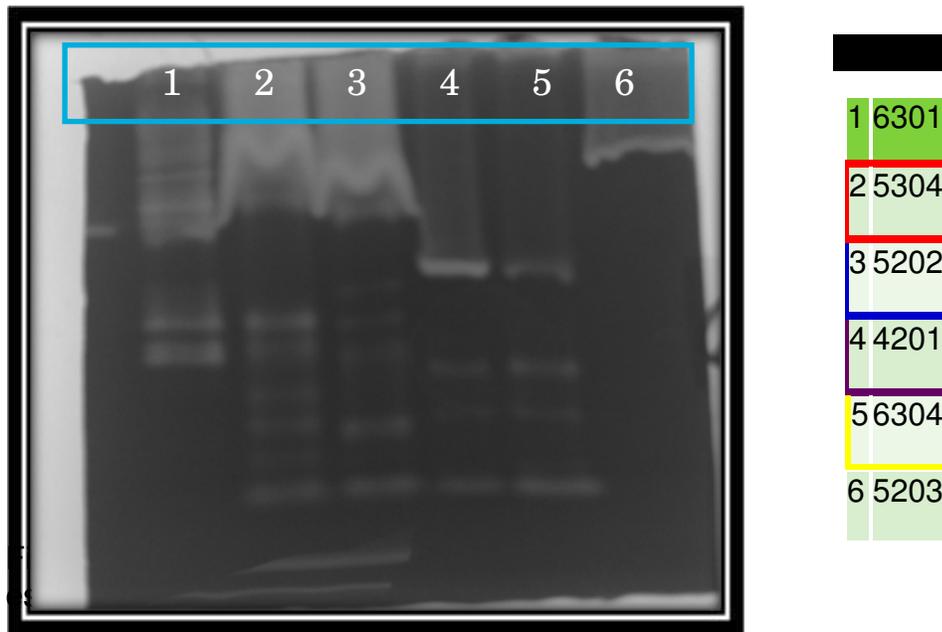


Fig. 14.- Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 60°C

En 80°C las cepas 5304 y 4201 presentaron mejor actividad proteolítica ya que en la cepa 5304 no se pierde ninguna de las bandas que aparecen en las temperaturas antes evaluadas, las cepas 5202 y 6304 presenta muy poca actividad a esta temperatura, la cepa 5203 no mostró actividad proteolítica a esta temperatura. (Fig.15).

Existe interés en encontrar proteasas activas a diversas temperaturas, y que soporten y actúen a pH's alcalinos por el periodo de tiempo que es necesario en el lavado, así como una buena actividad y resistencia a altas temperaturas durante los ciclos de lavado de algunos procesos industriales [44].

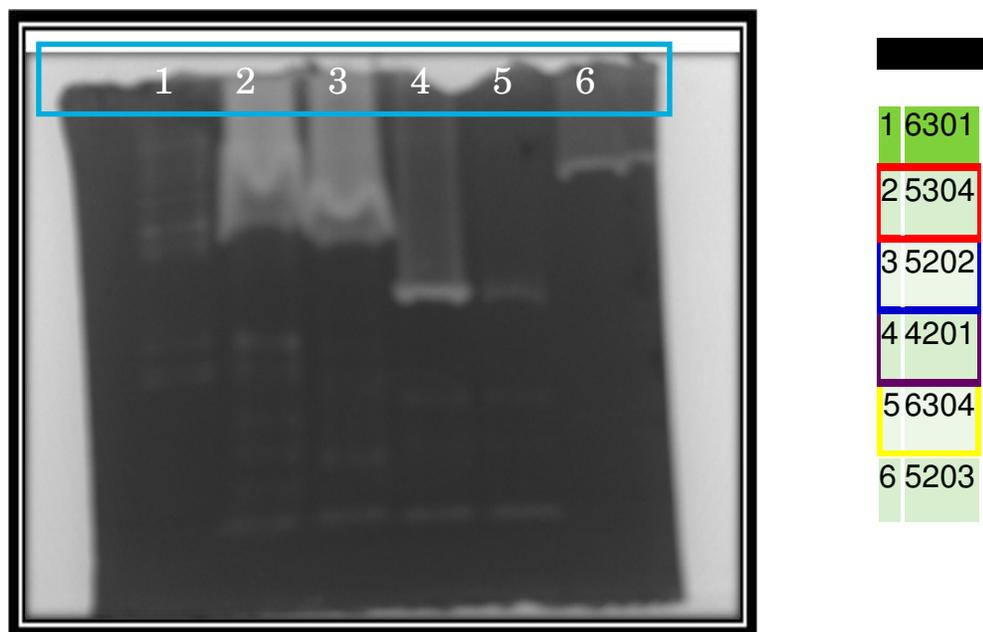


Fig. 15.- Resistencia enzimática de las cepas en estudio a 80°C

De las 6 cepas se seleccionó la cepa 5304 para continuar el estudio de la evaluación de la actividad proteolítica, ya que fue la que mostró tanto mejor estabilidad en las tres temperaturas probadas como en la intensidad y número bandas producidas.

5.5 Estudio del crecimiento de la cepa seleccionada de *Bacillus* sp.

En la fig.16 se observa la curva de crecimiento para nuestra cepa seleccionada, alcanzando el máximo de crecimiento a las 24h de incubación en caldo nutritivo a 37°C con una agitación de 150rpm. La fase exponencial termina a las 8hr de

incubación dando comienzo a la fase estacionaria que se prolonga hasta las 24h para después comenzar la fase de muerte.

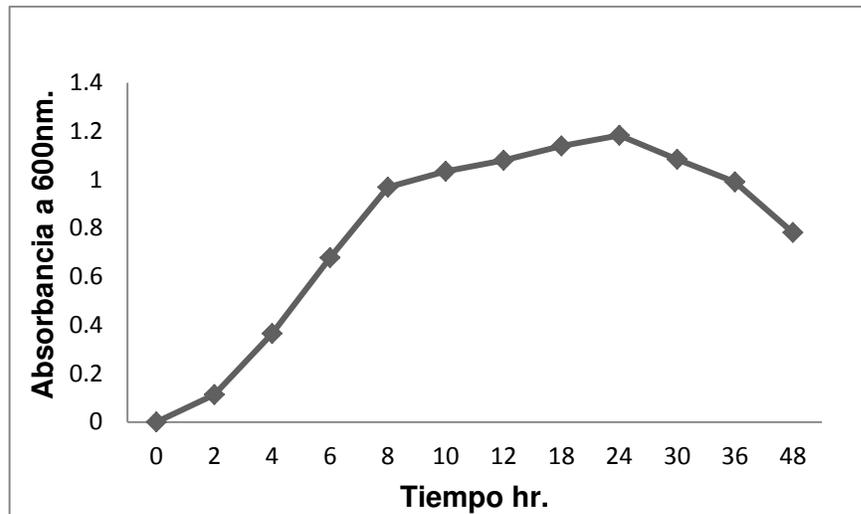


Fig. 16.- Curva de crecimiento de la cepa 5304 en caldo nutritivo a 37°C a 150rpm.

5.6 Evaluación de la Actividad Proteolítica

Se hicieron los diferentes ensayos experimentales a temperaturas 30°C, 40°C, 50°C y 60°C en pH 8 para identificar la temperatura en la cual se tenía la mayor actividad enzimática.

Una vez que se identificó la temperatura en la que se obtuvo un mayor número de Unidades de proteasa por mililitro (U/mL) que fue a 40°C, se hizo el ensayo a esta misma temperatura en pH 9 y 10 para observar si había un incremento o

decremento en la cantidad de U/mL por el efecto del pH. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Se observó un efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de los extractos de la cepa evaluada. a pH 8, encontrándose una mayor actividad a 40°C y 60°C (fig19). Ghorbel y col en el 2003 estudiaron una proteasa en *Bacillus cereus* con un óptimo de pH igual a la cepa 5304, reporta que en presencia de 2mM de Ca²⁺ su proteasa aumenta en un 500% de actividad, haciéndola resistente al aumento de temperatura [45].

A 30°C la actividad fue menor que a otras temperaturas, esta temperatura afecta el funcionamiento de la proteasa, disminuyendo su actividad, sin embargo a los 40°C se tiene el máximo de actividad proteolítica, teniendo 3 veces más U/mL (fig.17). Existen varios estudios (24, 25, 28), donde el óptimo de temperatura para las cepas en estudio en los estudios correspondientes es de 40°C.

Se observó mayor actividad proteolítica a 60°C, que la presentada a 30°C y 50°C., lo anterior coincide con lo reportado por Ghorbel y col. para una enzima producida por *B. cereus* [45].

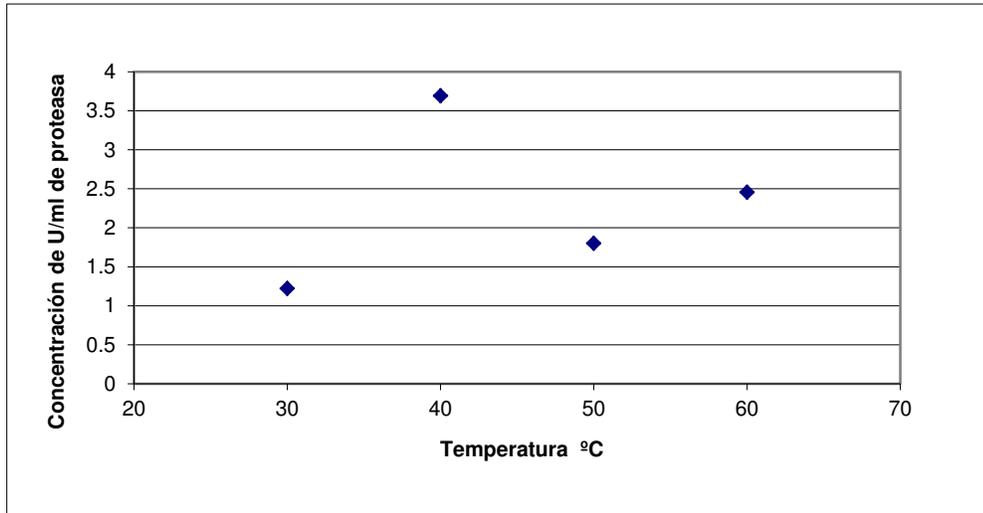


Fig. 17. Actividad Proteolítica de la cepa 5304 en pH 8 a temperaturas de 30°C a 60°C.

Se pudo observar un efecto del pH en la actividad de las proteasas del bacilo en estudio, encontrado su mejor actividad a pH 8, seguida del pH 9 y 10(fig.18) Este óptimo de pH coincide con reportes sobre proteasas de *Bacillus* [44,46].

Al aumentar el pH incubando la proteasa a la mejor temperatura de actividad se ve un decremento del 45% en la actividad, mientras que para la actividad en pH 10 existe una disminución del 48% en la actividad de proteasa. Es decir que si hay un cambio apreciable al bajar de pH 8 a 9 sin embargo no es igual de drástico el cambio de pH 9 a 10, lo que nos indica que a pH 10 hay actividad y tolerancia para el funcionamiento de la proteasa.

La eficiencia de la enzima en estudio puede aumentar con procesos de purificado, tanto incrementando su actividad como su tolerancia a rangos de temperatura y pH más amplios, ya que se pueden hacer estudios sobre la optimización de fuentes de nitrógeno y carbono para maximizar la cantidad de proteasa producida por la cepa. De igual forma, diversos investigadores han publicado estudios del efecto de inductores como iones Ca^{2+} y Mg^{2+} para la búsqueda del incremento en la actividad proteolítica.

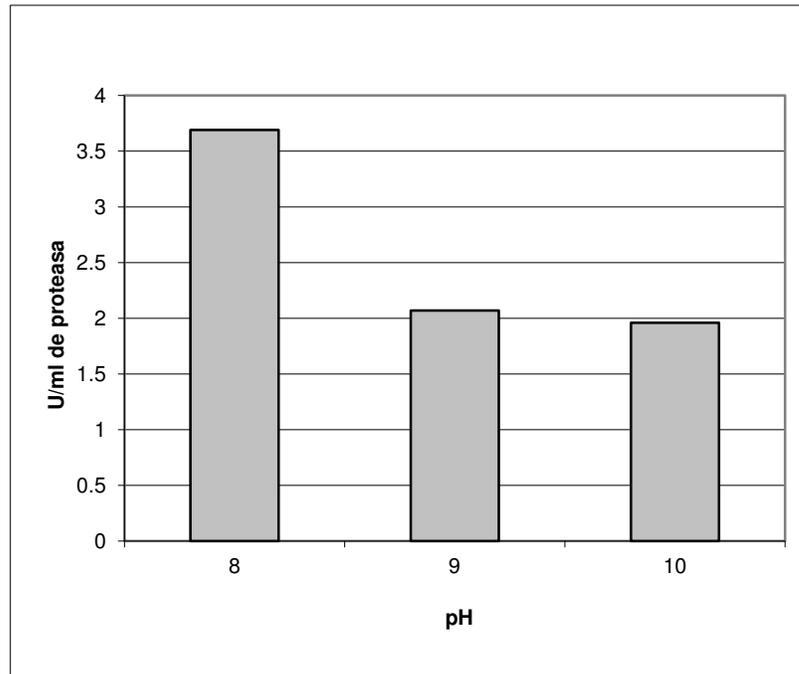


Fig. 18 Efecto del pH en la actividad proteolítica de la cepa 5304 a 40°C.

5.7 Ensayo de Actividad Hemolítica

Se observó actividad de remoción de la mancha de sangre, en las telas probadas con las diferentes soluciones de SDS adicionadas con el extracto de la cepa en estudio, pudiendo observarse notable efecto de remoción para las concentraciones más bajas probadas.

Existe una remoción completa de sangre al utilizar la enzima junto con el detergente, esto nos indica la actividad proteolítica de nuestra proteasa, así como una compatibilidad con detergentes, siendo utilizado SDS, un detergente iónico fuerte, existe una disminución en la remoción de la mancha de sangre conforme aumenta el porcentaje de SDS (fig.19), esto es por la fuerza iónica del detergente, desnaturalizando la proteasa e interfiriendo con la actividad de la enzima, sin embargo aún al 20% de SDS hay actividad proteolítica.

La enzima en estudio mostro actividad para la remoción de sangre después de un proceso de lavado de 24h a 40°C. Al término de las 24hr se lavó el trozo de tela con agua corriente para eliminar el SDS de la tela.

Se pudo observar actividad proteolítica, en presencia de SDS al 20% (fig.20) lo anterior indica que la enzima pudiera usarse como aditivo en los detergentes, sin embargo se deben hacer estudios de compatibilidad con detergentes comerciales.

Se pudo observar que en el tratamiento con SDS, a diferentes concentraciones se quedaba una marca de residuos de sangre. Al contrario de los trozos de tela en los que se añadió la enzima no se observó esta marca de residuos de sangre, es decir, hubo una proteólisis de la sangre lo cual ayudó a la eliminación completa de la mancha sanguínea.

Arulmani y colaboradores en el 2007 reportaron el empleo de una proteasa de *Bacillus laterosporus* utilizada a pH 9 en una temperatura de 60°C por 60 min como aditivo para diferentes detergentes, variando la actividad proteolítica entre los detergentes [47].

Además, para que una enzima pueda ser propuesta como aditivo en la industria de los detergentes debe mostrar ser activa a pH alcalino y temperaturas entre los 35°C hasta 80°C [42, 48]. Por lo anterior y como se pudo observar el EP en estudio cumple las características de pH y temperatura de actividad necesarias para ser aplicada en esta industria.

Efecto del SDS en la capacidad de remoción de sangre, del extracto proteico de la cepa en estudio.

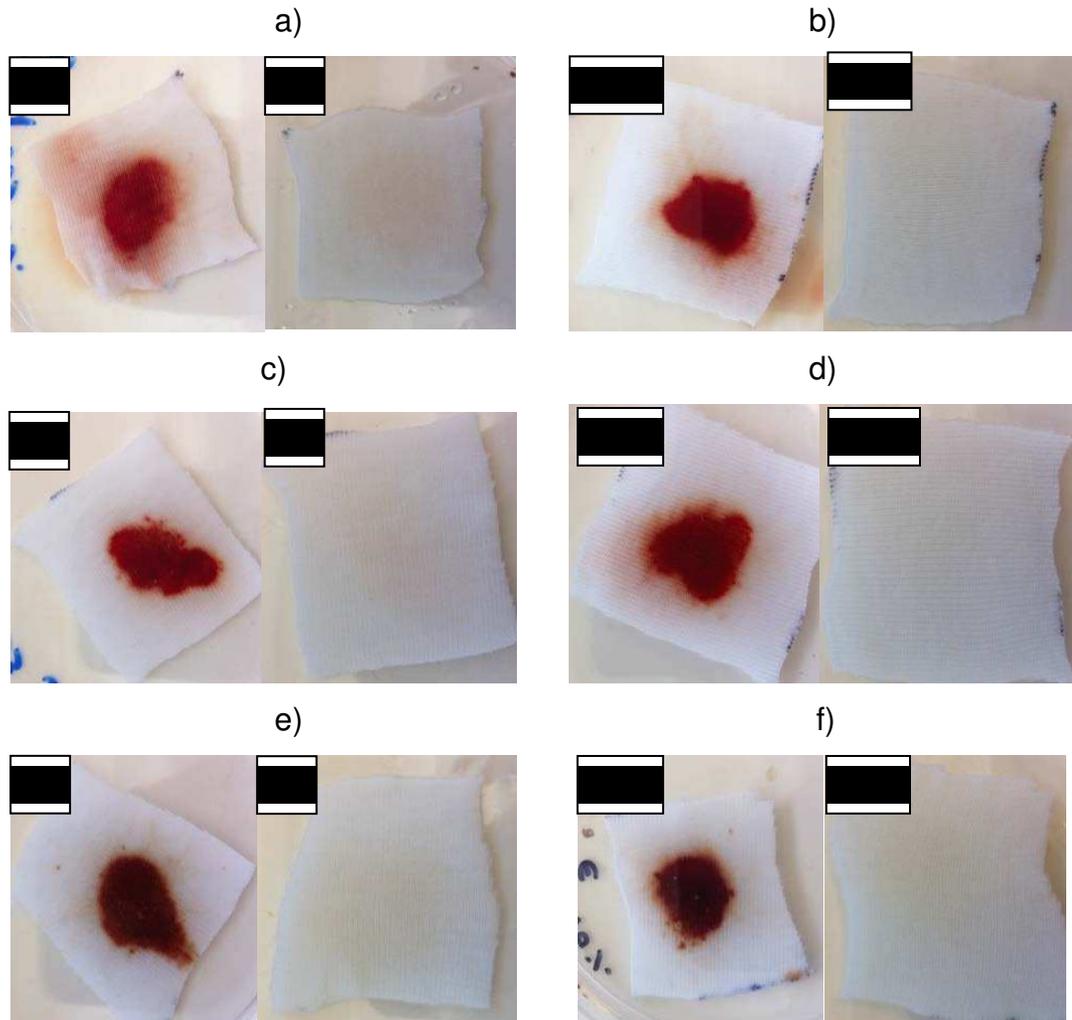


Fig.19 Muestras de sangre sin tratamiento a diferentes porcentajes de SDS a), c) y e). Muestras de sangre después del tratamiento con EP b), d) y f).

A y D: Antes y después de lavar. (Tratamientos sin EP)

A* y D*: Antes y después de lavar. (Tratamientos con EP)

- a) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 1%.
- b) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 1% con EP.
- c) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 5%.
- d) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 5% con EP
- e) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 10%
- f) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 10% con EP.

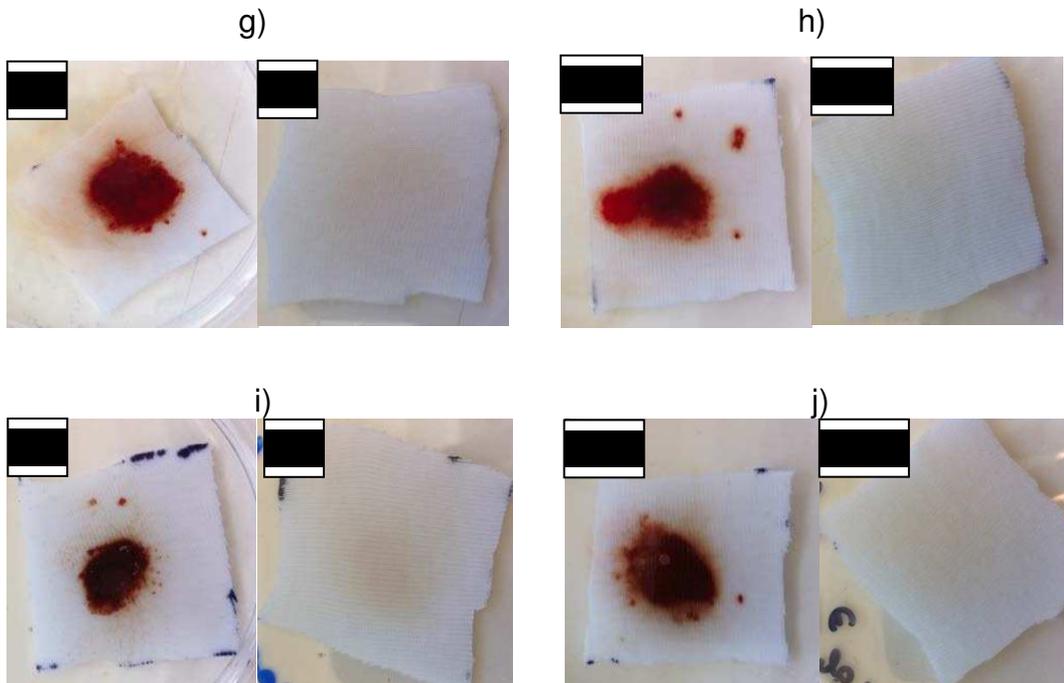


Fig.20 Muestras de sangre sin tratamiento a diferentes porcentajes de SDS g) y i). Muestras de sangre después del tratamiento con EP h) y j).

- g) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 15%
- h) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 15% con EP
- i) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 20%.
- j) Muestras de tela sometidas a tratamiento con SDS al 20% con EP.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

1. De las 17 cepas de *Bacillus* aisladas del suelo, el 80% presento actividad proteolítica.
2. Las proteasas producidas por las cepas en estudio mostraron actividad en un rango de pH de 7 a 10 y en un rango de T de 30°C a 80°C.
3. Las cepas seleccionadas de *Bacillus* muestran actividad proteolítica en presencia de SDS.
4. La cepa 5304 tiene una temperatura óptima de actividad proteolítica a 40°C.
5. El pH óptimo para la actividad de la proteasa estudiada, fue de 8.
6. La proteasa producida por la cepa de estudio, mostró actividad hemolítica, con uso potencial en la industria de los detergentes, debido a su compatibilidad con un detergente iónico fuerte y tolerancia a pH 10 y temperatura de 80°C.

6.2 Recomendaciones

1. Realizar un estudio para la optimización de la producción de enzimas proteolíticas, evaluando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para optimizar la cantidad de proteasa producida.
2. Examinar la influencia de iones metálicos en la estabilidad de la proteasa en diferentes temperaturas y distintos pH así como inhibidores de ésta.
3. Estudiar la compatibilidad de la enzima con diferentes detergentes, agentes surfactantes y oxidantes.
4. Hacer un estudio sobre la actividad de la enzima para un posible uso en la industria de las tenerías.

REFERENCIAS

- [1] Shiro Takewawa, Nobuyuki Uozumi, Norihiro Tsukagoshi, and Shigezo Udaka, (1991) Proteases Involved in generation of I- and A amylases from a large amylase precursor in *Bacillus polymyxa*. Journal of bacteriology, Vol. 173, No. 21 P. 6820-6825.
- [2] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, James T. Staley Volume III Springer 2005.
- [3] Biología de los Microorganismos. Michael T. Madigan, John Martinko, Jack Parker. Editorial Prentice Hall, 10 Edición. p. 404
- [4] Realpe M., Hernandez C., Agudelo C. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Biomedica, Junio año/vol. 22, numero 002 Instituto Nacional de Salud, Bogota Colombia pp. 106-109.
- [5] Ramírez Ninfa D., Serrano José A., Sandoval Horacio. Microorganismos Extremofilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas Vol. 37, No. 3 Julio-Septiembre 2006 pp 56-71
- [6] Matsubara H, Feder J. *The Enzyme*, Volume 3. New York: Academic Press, 2003.
- [7] Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, Vasanti V. Deshpande, Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases Microbiology and Molecular Biology Reviews, Sept. 1998, p.597–635
- [8] Muhammad Nadeem, Javed I., Shahjahan B., Qurat-ul-ain Syed Studies On Commercially Important Alkaline Protease From *Bacillus Lichniformis* N-2 Isolated From Decaying Organic Soil. Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem 2007; 32 (4) ; 171–177.
- [9] C. Ganesh Kumar, Hiroshi Takagi. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17 (1999) 561–594.

- [10] Fogarty WM, Griffin PJ, Joyce AM. Enzymes of *Bacillus* species—Part 2. *Process Biochem* 1974;9:27–29, 31, 33, 35.
- [11] Paliwal N, Singh SP, Garg SK. Cation-induced thermal stability of an Alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technol* 1994; 50:209–11.
- [12] Gold AM, Fahrney D. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin. *Biochem* 1964;3:783–91.
- [13] <http://www.chemistry.co.nz/deterginform.htm> © LA & HA Campbell 1998-2008 Fecha de consulta 17/Marzo/2011
- [14] Ho Tan Tai Louis, *Formulating Detergents and Personal Care Products A complete guide to product development*. American Oil Chemists' Society Press 2000.
- [15] Masse FWJL, van Tilburg R. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. *J Am Oil Chem Soc* 1983;60:1672–75.
- [16] H.-S. Joo¹, C.G. Kumar², G.-C. Park², S.R. Paik² and C.-S. Chang² Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii*-52: production and some properties. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 267–272
- [17] Rathindra Mohan Banik^a and Monika Prakash, Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus* *Microbiological Research* Volume 159, Issue 2, 30 June 2004, Pages 135-140
- [18] Meera Venugopal · A.V. Saramma An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian J. Microbiol.* (December 2007) 47:298–303
- [19] Kunammeni Adinarayana, P. Eillaiah, D. Siva Prasad. "Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11" *AAPS PharmSciTech* 2003; 4 Article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>)
- [20] Karl-Heinz Maurer "Detergent proteases" *Current Opinion in Biotechnology* 2004, 15:330–334 www.sciencedirect.com

- [21] Janice L. G., Francoise S., Franciani C., Philipp H., Adriano B., Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity *World J Microbiol Biotechnol* (2007) 23:375–382
- [22] Jiao Pan, Qing Huang, YiZheng Zhang Gene, Cloning and Expression of an Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus* *Current Microbiology* Vol. 49 (2004), pp. 165–169
- [23] V. P. Zambare, S. S. Nilegaonkar and P. P. Kanekar Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Volume 23, Number 11, 1569-1574, DOI: 10.1007/s11274-007-9402-y.
- [24] Hyung Joo Suh, Hyo Ku Lee. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1, *Journal of Protein Chemistry* Volume 20, Number 2, 165-169
- [25] F. Sharmin. and M. Rahman “Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* strain *FS-1*”. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript FP 06 009. Vol. IX. April, 2007
- [26] Fujiwara N, Yamamoto K., Decomposition of gelatin layers on X-ray films by the alkaline protease from *Bacillus* sp. *Hakkokogaku* 1987;65:531-34.
- [27] Fujiwara N, Yamamoto K, Masui A. Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *J Ferment Bioeng* 1991;72:306–8.
- [28] Gajju H, Bhalla TC, Agarwal HO. Utilization of thermostable alkaline protease from *Bacillus coagulans* PB-77 for silver recovery from used X-ray films. In: *Proceedings of 37th Annual Conference of Association of Microbiologists of India*, December 4–6, 1996, Chennai, India, pp. 79–79.
- [29] Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environmental Microbiology* 1996;62:2482–88.
- [30] Anshu Gupta, Ipsita Roy, R.K. Patel, S.P. Singh, S.K. Khare, One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography A* Volume 10.

- [31] J.M Kim, W.J Lim, H.J Suh, Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste, *Process Biochemistry* Volume 37, Issue 3, November 2001, Pages 287-291
- [32] Dalev PG. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technol* 1994;48:265–67.
- [33] <http://www.agroavicola.com/harina-de-pluma-hidrolizada> Agro Avícola Americana, (Albinter S.A.). Fecha de consulta 28/Abril/2011
- [34] Abhrajyoti Ghosh, Krishanu C., Dhrubajyoti C., Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008 35:825–834
- [35] Takami H, Nakamura S, Aono R, Horikoshi K. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. AH-101. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992;56:1667–69
- [36] Disney Ribeiro Dias, Danielle Marques Vilela, Marialice Pinto Coelho Silvestre, Rosane Freitas Schwan. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey *World Journal Microbiology Biotechnology* (2008) 24:2027–2034
- [37] Min-Yuan Wan & Hai-Yan Wang & Yi-Zheng Zhang & Hong Substrate Specificity and Thermostability of the Dehairing Alkaline Protease from *Bacillus pumilus*. *Appl Biochem Biotechnol* December 2008 DOI 10.1007/s12010-008-8497-4
- [38] P.L. Manachini and M.G. Fortina Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, Vol 20, No 6, June 1998, pp. 565–568
- [39] Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Shalihah Mahamad. Abu Bakar Salleh , Mahiran Basri A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) 34:509–517
- [40] Cupp-Enyard C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay Casein as a Substrate. *JoVE*19. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=899>, doi: 10.3791/899

- [41] C. Ganesh Kumar, Pradeep Parrack, "Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production" *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 757–762, 2003.
- [42] Maurer Karl-Heinz, Detergent Proteases, *Current Opinion in Biotechnology* 2004, 15:330-334 www.sciencedirect.com
- [43] C.G. Kumar, "Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*" *Letters in Applied Microbiology* 2002, 34, 13±17
- [44] Qasim Khalil Beg and Rani Gupta "Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*" *Enzyme and Microbial Technology* Volume 32, Issue 2, 3 February 2003, Pages 294-304
- [45] Basma Ghorbel, Alya Sellami-Kamoun and Moncef Nasri, Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1, *Enzyme and Microbial Technology* Volume 32, Issue 5, 8 April 2003, Pages 513-518
- [46] Wellington Cristina Almeida do Nascimento; Meire Leis Leal Martins "Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp" *Braz. J. Microbiol.* vol.35 no.1-2 São Paulo Jan./June 2004
- [47] Manalvan Arulmani, Kalaichelvan A., Kalyanasundaram V., Perumal A., Manavalan A. and P. Thangavelu K. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus* -AK1 *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Volume 23, Number 4, 2007, 475-481, DOI: 10.1007/s11274-006-9249-7
- [48] Manavalan A., Kalaichelvan A. Kalyanasundaram V, Perumal A., Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK11 *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007 23:475–481