

Tesis de Posgrado

Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*

Ferrero, Marcela Alejandra

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferrero, Marcela Alejandra. (1995). Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2745_Ferrero.pdf

Cita tipo Chicago:

Ferrero, Marcela Alejandra. "Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2745_Ferrero.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"ESTUDIOS DE PRODUCCION DE PROTEASAS EN ESPECIES
DEL GENERO *Bacillus*".

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

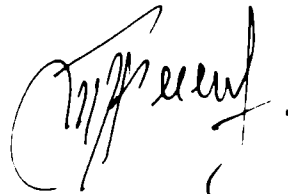
AUTOR: Licenciada Marcela Alejandra Ferrero

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Faustino Siñeriz

LUGAR DE TRABAJO: Planta Piloto de Procesos Industriales
Microbiológicos (PROIMI), CONICET-MIRCEN. San Miguel de
Tucumán, Tucumán, Argentina.



Dr. Faustino Siñeriz
director de tesis



Lic. Marcela A. Ferrero
tesista

a la memoria de mi madre

a mi padre

a mis queridos César y Santi

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Faustino Siñeriz, quien permitió la realización en PROIMI de este trabajo de tesis; por su apoyo y su confianza desde que me inicié en la investigación, aún siendo estudiante, y por su interés en mi constante progreso.

Al Dr. Guillermo Castro, con quien me inicié en la investigación y en el estudio de *Bacillus*, por su gran aporte a mi formación, críticas y estímulo.

Al Ing. Danley Callieri y a las Dras. Cármen Sánchez Rivas y Beatriz Méndez, por sus consejos, su experiencia y estímulo desinteresados.

A la Dra. Alicia Ragout, quien me alentó y ayudó permanentemente, sobre todo en mis comienzos en Tucumán, por su confianza y su amistad desinteresadas.

A mis compañeros Oscar Garro, Luis Ducrey, Carlos Abate, Mario Baigorí, Pedro Córdoba, por su desinteresada colaboración en este constante aprendizaje.

Al Dr. Oscar Molina y a la Ing. Nora Perotti, por sus consejos, su desinteresado apoyo a mi formación y su confianza.

A las Sras. Nené de Fanjul y Linda Hughes, por su asistencia técnica y su predisposición desinteresada.

A Don Salvador Borgia y Doña Hilda Luque, por su gran colaboración y esfuerzo en la limpieza y preparación del material de trabajo.

A todos mis compañeros de PROIMI, especialmente aquellos que colaboraron en alguna medida en la realización de este trabajo de tesis, por su ayuda y estímulo constantes.

A César, mi compañero de todos los días, quien comparte mis éxitos y fracasos, pero siempre alentándome y comprendiéndome con su paciencia y su cariño.

A Santiago, quien con sus escasos añitos me enseñó el verdadero sentido de la vida.

A todos aquellos que por su calidad humana, tendrán mi eterno agradecimiento, porque compartieron muchos momentos de esta etapa de mi vida, dentro y fuera del instituto.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCION.....	1
1.1	EL MICROORGANISMO.....	2
1.1.1	El género <i>Bacillus</i> . Características generales....	2
1.1.2	Taxonomía. Clasificación microbiológica.....	2
1.1.3	Importancia industrial de <i>Bacillus</i>	4
1.2	PROTEASAS MICROBIANAS.....	5
1.2.1	Importancia económica.....	5
1.2.2	Características y función.....	6
1.2.3	Proteasas producidas por <i>Bacillus</i>	8
1.2.4	Regulación de la síntesis de proteasa alcalina en <i>Bacillus</i>	10
1.3	METODOS DE CULTIVO Y PRODUCCION DE ENZIMAS.....	11
1.3.1	Producción de proteasas microbianas.....	11
1.3.2	Sistemas de cultivo de microorganismos.....	12
1.3.2.1	Cultivos por lote (CL).....	13
1.3.2.2	Cultivos por lote alimentado (CLA).....	14
1.3.2.3	Cultivo continuo (CC).....	15
1.3.2.4	Discusión acerca de la conveniencia de la utilización de los métodos antes descritos.....	19
1.4	OBJETIVOS.....	21
2	MATERIALES Y METODOS.....	22

2.1	RELEVAMIENTO DE CEPAS PRODUCTORAS Y	
	CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.....	23
2.1.1	Técnicas de aislamiento.....	23
2.1.2	Medios de cultivo.....	24
2.1.3	Pruebas bioquímicas para la caracterización	
	microbiológica de la cepa aislada.....	27
2.1.3.1	Degradación de aceite de oliva.....	27
2.1.3.2	Degradación de ADN.....	27
2.1.3.3	Degradación de almidón.....	28
2.1.3.4	Degradación de carboximetilcelulosa.....	29
2.1.3.5	Degradación de caseína.....	29
2.1.3.6	Licuación de gelatina.....	30
2.1.3.7	Degradación de poli-oxietilen sorbitanos.....	30
2.1.3.8	Degradación de pululano.....	31
2.1.3.9	Degradación de urea.....	31
2.1.3.10	Ensayos de tolerancia al NaCl.....	32
2.1.3.11	Crecimiento microbiano a diferentes pHs del	
	medio.....	32
2.1.3.12	Otros ensayos de caracterización.....	32
2.1.3.12.1	Crecimiento anaeróbico.....	32
2.1.3.12.2	Crecimiento en agar Mac Conkey.....	33
2.1.3.12.3	Desaminación de fenilalanina.....	33
2.1.3.12.4	Ensayo de catalasa.....	34
2.1.3.12.5	Producción de dihidroxiacetona.....	34
2.1.3.12.6	Producción de gas.....	35
2.1.3.12.7	Producción de indol.....	35
2.1.3.12.8	Reacción de Voges-Proskauer - Rojo de Metilo....	36

2.1.3.12.9	Reducción de nitratos.....	36
2.1.3.12.10	Utilización de citrato.....	37
2.1.3.12.11	Sistema API 50 CH.....	37
2.1.3.12.12	Ensayo de sensibilidad a antibióticos.....	38
2.2	ESTUDIOS DE PRODUCCION DE PROTEASAS.....	39
2.2.1	Microorganismo. Pureza del cultivo.	
	Conservación de la cepa.....	39
2.2.2	Medios de cultivo.....	40
2.2.3	Condiciones de cultivo.....	41
2.2.4	Crecimiento microbiano.....	42
2.2.5	Determinación de actividades enzimáticas.....	43
2.2.6	Determinaciones bioquímicas.....	44
2.2.6.1	Determinación de glicerol.....	44
2.2.6.2	Cuantificación de almidón.....	45
2.2.6.3	Determinación de glucosa.....	46
2.2.6.4	Determinación de proteínas.....	46
2.2.6.5	Determinación de amonio.....	47
2.2.7	Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.....	48
2.2.8	Condiciones del estado estacionario.....	48
2.2.9	Determinación de D_c y μ_m en cultivo continuo.....	49
2.2.10	Ensayos de pulso en cultivo continuo.....	50
2.3	ESTUDIOS ENZIMATICOS.....	50
2.3.1	Ensayos de purificación enzimática.....	50
2.3.1.1	Precipitación con acetona.....	51
2.3.1.2	Precipitación con sulfato de amonio.....	51

2.3.1.3	Concentración de la actividad proteolítica con CENTRICOM.....	52
2.3.2	Determinación del pH óptimo de actividad de proteasa alcalina.....	53
2.3.3	Determinación de la temperatura óptima de la actividad de proteasa alcalina.....	53
2.3.4	Estabilidad térmica de la proteasa alcalina.....	54
2.3.5	Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad enzimática.....	54
2.3.6	Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas menores de 10 KD.....	55
2.3.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	55
3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
3.1	RELEVAMIENTO DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.....	59
3.1.1	Aislamientos.....	59
3.1.2	Microscopía.....	61
3.1.3	Ensayos morfológicos y bioquímicos de la cepa MIR 29.....	62
3.2	ESTUDIOS DE LA PRODUCCION DE PROTEASA ALCALINA EN <i>B. licheniformis</i> MIR 29.....	70
3.2.1	Preparación del inóculo de la cepa MIR 29.....	71
3.2.2	Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de proteasas neutra y alcalina.....	71

3.2.3	Efecto del pH del cultivo en la producción de proteasa alcalina.....	75
3.2.4	Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de proteasa alcalina.....	76
3.2.5	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de proteasa alcalina.....	79
3.2.6	Producción de proteasa alcalina en fermentadores instrumentados.....	80
3.2.6.1	Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento microbiano y la producción de proteasa alcalina.....	81
3.2.6.2	Efecto del alcalinizante en el crecimiento y la producción de proteasa alcalina.....	85
3.2.6.3	Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.....	87
3.2.6.4	Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con caseína.....	90
3.2.6.5	Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con glucosa.....	91
3.2.6.6	Ensayo de pulsos de glucosa y caseína en cultivo continuo.....	95
3.2.6.7	Efecto de la fuente nitrogenada en incluida en el medio de producción.....	100
3.2.7	Ensayo de inducción de la caseína sobre la síntesis de proteasa alcalina.....	102

3.3	ESTUDIOS ENZIMATICOS DE LA PROTEASA ALCALINA PARCIALMENTE PURIFICADA.....	106
3.3.1	Resultados de la purificación parcial de proteasa alcalina con acetona y CENTRICOM.....	107
3.3.2	Determinación del pH y temperatura óptimos de la actividad proteolítica.....	109
3.3.3	Estabilidad térmica de la actividad proteolítica.....	112
3.3.4	Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad proteolítica.....	112
3.3.5	Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas pequeñas.....	114
3.3.6	Electroforesis.....	116
4	CONCLUSIONES.....	118
5	ABREVIATURAS.....	125
6	BIBLIOGRAFIA.....	128

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCION.....	1
1.1	EL MICROORGANISMO.....	2
1.1.1	El género <i>Bacillus</i> . Características generales....	2
1.1.2	Taxonomía. Clasificación microbiológica.....	2
1.1.3	Importancia industrial de <i>Bacillus</i>	4
1.2	PROTEASAS MICROBIANAS.....	5
1.2.1	Importancia económica.....	5
1.2.2	Características y función.....	6
1.2.3	Proteasas producidas por <i>Bacillus</i>	8
1.2.4	Regulación de la síntesis de proteasa alcalina en <i>Bacillus</i>	10
1.3	METODOS DE CULTIVO Y PRODUCCION DE ENZIMAS.....	11
1.3.1	Producción de proteasas microbianas.....	11
1.3.2	Sistemas de cultivo de microorganismos.....	12
1.3.2.1	Cultivos por lote (CL).....	13
1.3.2.2	Cultivos por lote alimentado (CLA).....	14
1.3.2.3	Cultivo continuo (CC).....	15
1.3.2.4	Discusión acerca de la conveniencia de la utilización de los métodos antes descritos.....	19
1.4	OBJETIVOS.....	21
2	MATERIALES Y METODOS.....	22

2.1	RELEVAMIENTO DE CEPAS PRODUCTORAS Y	
	CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.....	23
2.1.1	Técnicas de aislamiento.....	23
2.1.2	Medios de cultivo.....	24
2.1.3	Pruebas bioquímicas para la caracterización	
	microbiológica de la cepa aislada.....	27
2.1.3.1	Degradación de aceite de oliva.....	27
2.1.3.2	Degradación de ADN.....	27
2.1.3.3	Degradación de almidón.....	28
2.1.3.4	Degradación de carboximetilcelulosa.....	29
2.1.3.5	Degradación de caseína.....	29
2.1.3.6	Licuação de gelatina.....	30
2.1.3.7	Degradación de poli-oxietilen sorbitanos.....	30
2.1.3.8	Degradación de pululano.....	31
2.1.3.9	Degradación de urea.....	31
2.1.3.10	Ensayos de tolerancia al NaCl.....	32
2.1.3.11	Crecimiento microbiano a diferentes pHs del	
	medio.....	32
2.1.3.12	Otros ensayos de caracterización.....	32
2.1.3.12.1	Crecimiento anaeróbico.....	32
2.1.3.12.2	Crecimiento en agar Mac Conkey.....	33
2.1.3.12.3	Desaminación de fenilalanina.....	33
2.1.3.12.4	Ensayo de catalasa.....	34
2.1.3.12.5	Producción de dihidroxiacetona.....	34
2.1.3.12.6	Producción de gas.....	35
2.1.3.12.7	Producción de indol.....	35
2.1.3.12.8	Reacción de Voges-Proskauer - Rojo de Metilo....	36

2.1.3.12.9	Reducción de nitratos.....	36
2.1.3.12.10	Utilización de citrato.....	37
2.1.3.12.11	Sistema API 50 CH.....	37
2.1.3.12.12	Ensayo de sensibilidad a antibióticos.....	38
2.2	ESTUDIOS DE PRODUCCION DE PROTEASAS.....	39
2.2.1	Microorganismo. Pureza del cultivo.	
	Conservación de la cepa.....	39
2.2.2	Medios de cultivo.....	40
2.2.3	Condiciones de cultivo.....	41
2.2.4	Crecimiento microbiano.....	42
2.2.5	Determinación de actividades enzimáticas.....	43
2.2.6	Determinaciones bioquímicas.....	44
2.2.6.1	Determinación de glicerol.....	44
2.2.6.2	Cuantificación de almidón.....	45
2.2.6.3	Determinación de glucosa.....	46
2.2.6.4	Determinación de proteínas.....	46
2.2.6.5	Determinación de amonio.....	47
2.2.7	Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.....	48
2.2.8	Condiciones del estado estacionario.....	48
2.2.9	Determinación de D_c y μ_m en cultivo continuo.....	49
2.2.10	Ensayos de pulso en cultivo continuo.....	50
2.3	ESTUDIOS ENZIMATICOS.....	50
2.3.1	Ensayos de purificación enzimática.....	50
2.3.1.1	Precipitación con acetona.....	51
2.3.1.2	Precipitación con sulfato de amonio.....	51

2.3.1.3	Concentración de la actividad proteolítica con CENTRICOM.....	52
2.3.2	Determinación del pH óptimo de actividad de proteasa alcalina.....	53
2.3.3	Determinación de la temperatura óptima de la actividad de proteasa alcalina.....	53
2.3.4	Estabilidad térmica de la proteasa alcalina.....	54
2.3.5	Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad enzimática.....	54
2.3.6	Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas menores de 10 KD.....	55
2.3.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	55
3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
3.1	RELEVAMIENTO DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.....	59
3.1.1	Aislamientos.....	59
3.1.2	Microscopía.....	61
3.1.3	Ensayos morfológicos y bioquímicos de la cepa MIR 29.....	62
3.2	ESTUDIOS DE LA PRODUCCION DE PROTEASA ALCALINA EN <i>B. licheniformis</i> MIR 29.....	70
3.2.1	Preparación del inóculo de la cepa MIR 29.....	71
3.2.2	Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de proteasas neutra y alcalina.....	71

3.2.3	Efecto del pH del cultivo en la producción de proteasa alcalina.....	75
3.2.4	Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de proteasa alcalina.....	76
3.2.5	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de proteasa alcalina.....	79
3.2.6	Producción de proteasa alcalina en fermentadores instrumentados.....	80
3.2.6.1	Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento microbiano y la producción de proteasa alcalina.....	81
3.2.6.2	Efecto del alcalinizante en el crecimiento y la producción de proteasa alcalina.....	85
3.2.6.3	Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.....	87
3.2.6.4	Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con caseína.....	90
3.2.6.5	Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con glucosa.....	91
3.2.6.6	Ensayo de pulsos de glucosa y caseína en cultivo continuo.....	95
3.2.6.7	Efecto de la fuente nitrogenada en incluida en el medio de producción.....	100
3.2.7	Ensayo de inducción de la caseína sobre la síntesis de proteasa alcalina.....	102

3.3	ESTUDIOS ENZIMATICOS DE LA PROTEASA ALCALINA PARCIALMENTE PURIFICADA.....	106
3.3.1	Resultados de la purificación parcial de proteasa alcalina con acetona y CENTRICOM.....	107
3.3.2	Determinación del pH y temperatura óptimos de la actividad proteolítica.....	109
3.3.3	Estabilidad térmica de la actividad proteolítica.....	112
3.3.4	Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad proteolítica.....	112
3.3.5	Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas pequeñas.....	114
3.3.6	Electroforesis.....	116
4	CONCLUSIONES.....	118
5	ABREVIATURAS.....	125
6	BIBLIOGRAFIA.....	128

1.INTRODUCCION

1.1- EL MICROORGANISMO.

1.1.1- EL GENERO *Bacillus*. Características generales.

Las bacterias que forman endosporas resistentes al calor son clasificadas en diversos géneros de la familia *Bacillaceae*. El género *Bacillus* es el más grande y mejor conocido de la familia, la cual incluye los géneros *Sporosarcina* y *Sporolactobacillus* (Berkeley y col., 1981).

Como características generales y distintivas del género *Bacillus* podemos citar: células con forma de bastón; endosporas muy resistentes a condiciones adversas y no más de una por célula; Gram positivo o variable; aerobios o anaerobios facultativos; producción de catalasa; ocupan una gran diversidad de habitats por la persistencia de sus esporas. La capacidad de ciertas cepas de tolerar altas o bajas temperaturas y altos o bajos pHs hacen a este grupo particularmente importante como fuente de enzimas comerciales (Norris y col., 1981). Representativos de este género están ampliamente distribuidos en suelo, agua y aire, donde están involucrados en una amplia gama de transformaciones bioquímicas.

1.1.2- Taxonomía. Clasificación microbiológica.

El nombre genérico *Bacillus* fue primero establecido en 1872 por

Ferdinand Cohn para incluir bacterias en forma de bastón que crecían en filamentos. En 1876, Cohn y Koch independientemente detectaron que dos de las tres especies reconocidas del género, *B. subtilis* y *B. anthracis*, formaban una estructura especial, la endospora bacterial o espora, que no podía ser fácilmente destruída por simple calentamiento.

La taxonomía temprana de los bacilos fue confusa, habiéndose descrito más de 150 especies sobre la base de simples características fisiológicas y ecológicas. En un estudio comparativo de 1134 cepas sustentando 179 nombres de especies diferentes o designadas solamente como *Bacillus* sp., Smith (1952) utilizó la forma, localización y tamaño de la espora dentro del esporangio, como una forma de diferenciar grupos dentro del género, y así redujo a 19 el número de especies. Otros intentos por clasificar y ordenar las especies fueron insuficientes (Hobbs, 1983; Gordon, 1973; Gordon, 1981). Posteriores estudios moleculares encontraron un amplio rango de relación de bases en el ADN cromosomal, indicando diversidad genética (Priest, 1981; Fahmy, 1985). Otra dificultad encontrada en la clasificación surgió al comparar datos de hibridización ADN-ARN, que indicaron relaciones filogenéticas con otros géneros. De los estudios de taxonomía numérica realizados por diversos autores (Bonde, 1981; Logan y col., 1984; Priest y col., 1988), se coincidió en la necesidad de dividir al género en 6 grupos (A-F), en base a una clasificación numérica del género.

1.1.3- Importancia industrial de *Bacillus*.

La gran diversidad metabólica de *Bacillus* sp., junto con la baja incidencia de patogenicidad, ha permitido el uso de cepas de este grupo en un amplio rango de procesos industriales. Cepas de *Bacillus* son usadas para la producción de cuatro principales tipos de productos: 1) enzimas, 2) antibióticos, 3) bioquímica fina incluyendo realzantes de sabor y suplementos alimenticios, y 4) insecticidas. Algunos miembros del género *Bacillus* son la mayor fuente de enzimas hidrolizantes para los mercados alimenticios y detergentes (Harwood, 1989).

El metabolismo de *Bacillus* se adapta a una pérdida de continuidad de nutrientes por una variedad de caminos, ya sea excretando enzimas hidrolíticas y produciendo endosporas resistentes al calor, radiación y desecación, que pueden sobrevivir en un estado latente por muchos años, si no centurias (Sneath, 1962). La esporulación y otros cambios metabólicos que ocurren al final de la fase de crecimiento exponencial son muy importantes en la productividad de *Bacillus* sp. Este es el momento en que la síntesis de muchas de sus proteínas de interés comercial son inducidas. Esto se aplica no solo a la producción de enzimas como α -amilasa y proteasas de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*, sino también a las toxinas insecticidas sintetizadas por *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, y *B. popilliae* (Priest, 1989).

Una de las propiedades de *Bacillus* sp. que los hace atractivos para los procesos comerciales, es su capacidad de excretar altos niveles de proteínas al medio de crecimiento. En este sentido confiere una importante ventaja competitiva para la producción de sustancias farmacéuticas.

Aparte de la bien establecida patogenicidad de *B. anthracis*, un patógeno de humanos y algunos animales, *B. cereus* y el grupo de patógenos de insectos relacionados a *B. thuringiensis*, muchas otras especies no son patógenas o causan solamente infecciones oportunistas. Los excelentes sistemas fisiológicos y genéticos han permitido, por ejemplo, el aislamiento de mutantes que producen ácido glutámico a un costo tan eficiente como lo hace *Corynebacterium glutamicum*.

La ingeniería genética ha incrementado significativamente la productividad de *Bacillus* para ciertos productos tradicionales tales como α -amilasa y es factible hacer lo mismo con otras enzimas.

1.2- PROTEASAS MICROBIANAS.

1.2.1- Importancia económica.

Desde su introducción hacia 1960 como aditivos de detergentes, el uso comercial de las proteasas ha ido progresando rápidamente. Como la más importante del mercado de enzimas, las proteasas representan el 60 % de las

ventas totales (Godfrey, 1983), siendo las 2/3 partes de origen microbiano. Las más importantes proteasas microbianas comercializadas son las proteasas alcalinas de *B. licheniformis*, utilizadas en la fabricación de detergentes, proteasas de *Mucor* usadas en la manufactura de quesos, y proteasas de *Aspergillus oryzae* para la modificación de la pasta y producción de salsa de soja.

1.2.2- Características y función.

Las proteasas son un grupo de enzimas altamente complejas que no solo catalizan la hidrólisis completa de una proteína, sino que pueden ser altamente específicas y modificar selectivamente una proteína por hidrólisis limitada. Poseen una amplia variedad de propiedades fisico-químicas y propiedades catalíticas.

Algunas de las funciones de la célula en las que están involucradas las proteasas son:

1- Recambio de proteínas: es un proceso similar a todos los organismos, por el cual se eliminan proteínas anormales y es esencial para la adaptación de las células a nuevas condiciones ambientales, especialmente en respuesta a inanición de nutrientes (Wolf, 1980).

2- Esporulación: condiciones de inanición o de carencia de nutrientes inducen

la formación de esporas bacterianas (Kornberg, 1968) y fúngicas (Wood, 1978). Los procesos proteolíticos cumplen un importante papel en la transición del crecimiento vegetativo a la formación de esporas. En bacterias al menos dos proteasas intracelulares son activadas en esta transición (Burnett, 1986) y la producción de proteasas extracelulares, si bien coincide con la esporulación, no está confirmado si son esenciales para el desarrollo de la spora (Kauamura, 1984).

3- Germinación: durante la germinación de la spora bacteriana, las proteasas proveen de aminoácidos disponibles para la síntesis de nuevas enzimas requeridas para el proceso (Maurizi, 1980).

4- Modificación enzimática: en esta función están involucradas la activación de precursores inactivos a formas activas por proteólisis, y la inactivación de enzimas durante los cambios en el desarrollo y cambios en los procesos fisiológicos.

5- Maduración de proteínas y secreción: muchas proteínas son sintetizadas como precursores y seguidamente procesadas por proteólisis limitada, obteniéndose así productos maduros. Proteínas traslocadas a través o integradas en la membrana celular son sintetizadas como precursores y secretadas por proteólisis de un "péptido señal" al medio externo (Wolf,

1982).

6- En particular las proteasas extracelulares, están involucradas en la degradación de sustratos polipeptídicos a moléculas más pequeñas que puedan ser absorbidas por la célula.

Las enzimas exocelulares tienen una gran ventaja sobre las intracelulares: 1) mayor estabilidad de la enzima a condiciones como temperatura, fuerza iónica y pH, debido a que son liberadas al medio en el ambiente de crecimiento del microorganismo; 2) existe la posibilidad de reciclaje del microorganismo, reduciendo costos y tiempos de producción; 3) los métodos de separación del producto y purificación son más fáciles y baratos.

1.2.3- Proteasas producidas por *Bacillus*.

El sistema de clasificación de las proteasas microbianas, recomendada por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (Academic Press, 1978), divide las enzimas proteolíticas en dos grupos - peptidasas y proteasas - en base a su naturaleza de ataque. Las exopeptidasas remueven aminoácidos terminales o dipéptidos, y pueden subdividirse de acuerdo a si actúan atacando al C o al N terminal (carboxi- o aminopeptidasas)

o sobre un dipéptido. Las proteasas son clasificadas por su mecanismo catalítico en cuatro grupos. Esta clasificación es determinada indirectamente por la reactividad a inhibidores que reaccionan con residuos particulares en la región del sitio activo. Los cuatro grupos son 1) serina-proteasas (EC 3.4.21); 2) cisteína-proteasas (EC 3.4.22); 3) aspártico-proteasas (EC 3.4.23) y 4) metalo-proteasas (EC 3.4.24) (Moriyama, 1974).

Cepas de *Bacillus* excretan metalo y/o serina-proteasas, mientras que las restantes, también llamadas proteasas ácidas, son producidas por hongos y eucariotes superiores.

Las metalo-proteasas son endoenzimas que cortan preferentemente uniones con el grupo amino de la leucina o fenilalanina; requieren cinc para su actividad y calcio para su estabilidad; tienen un peso molecular de 30 a 40 Kd y un pH óptimo de actividad cercano al neutro, debido a ello también se la denomina proteasa neutra. Son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y por o-fenantrolina.

La enzima es utilizada industrialmente para depilar pieles en curtiembres, en la reducción del contenido de gluten en harinas para panificación y en la industria alimenticia (Ward, 1983).

Las serina-proteasas hidrolizan ésteres terminales simples, no tienen requerimientos de iones metálicos y son inhibidas por PMSF y DFP, exhiben un pH óptimo de actividad entre 9 y 11, poseen un peso molecular entre 20 y 30 KD y poseen además actividad de esterasa (Keay y col., 1970).

La aplicación principal de estas enzimas es en la industria de los detergentes, constituyendo el 35 % del total de ventas de enzimas microbianas.

1.2.4- Regulación de la síntesis de proteasa alcalina en *Bacillus*.

La máxima síntesis de enzimas exocelulares normalmente ocurre antes de la esporulación. La transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento está a menudo acompañada por la desaparición de la fuente de carbono del medio y los cambios en las condiciones de cultivo desreprimen muchos genes sujetos a represión catabólica. Como consecuencia, es difícil decidir si la aparición de una enzima es debido a una alteración del ambiente o a la expresión de genes específicos de esporulación (Priest, 1977). No se conoce con exactitud si las serina-proteasas juegan un papel en el mecanismo de regulación de la formación de esporas en *Bacillus*, aunque sí es sabido que la regulación de su expresión tiene que ver con ella (Vasantha, 1980; Dancer, 1975; Basalp, 1992).

Se encontraron mutantes de esporulación que producen serina-proteasa exocelular, y mutantes que son asporogénicos pero que retuvieron la actividad de serina- proteasas normal a temperatura no permisiva, de manera que la relación entre la síntesis de serina-proteasas y la esporulación son hasta ahora desconocidas (Ferrari, 1986). Una serina-proteasa intracelular se produce

exclusivamente durante la esporulación, y tiene función en el recambio de proteínas durante este proceso (Reysett y col., 1972).

1.3- METODOS DE CULTIVO Y PRODUCCION DE ENZIMAS.

1.3.1.- Producción de proteasas microbianas.

Dos métodos de cultivo son utilizados para la producción de proteasas microbianas:

El cultivo semisólido fue el método tradicional de producción de enzimas microbianas. Aún es utilizado en la producción de enzimas fúngicas, tales como las proteasas de especies de *Aspergillus* y *Mucor*.

Los métodos de cultivo sumergido, sin embargo, dominan en la producción por su bajos costos y escasos riesgos de contaminación, y por la facilidad de adaptación de métodos modernos de control a estos procesos (Kalisz, 1988).

El equipamiento tradicional usado para la producción de enzimas consta de altos tanques cilíndricos de acero inoxidable (biorreactores) con 10 - 100 toneladas de capacidad, conteniendo fuertes agitadores mecánicos y aireadores. Los medios de cultivo son elegidos de manera que abaraten el costo de producción y soporten un buen crecimiento del microorganismo. Los típicos medios de cultivo usados en la producción de proteasas de *Bacillus* sp.,

por ejemplo, contienen (g/l): hidrolizado de almidón, 50; caseína, 20; macerado de soja, 20; Na_2HPO_4 , 10. Compuestos tales como glucosa, la cual reprime la formación de enzima, son mantenidos en concentraciones mínimas durante el ciclo completo, o usando carbohidratos que se metabolizan lentamente como lactosa o almidón. La composición del medio debe ser tal que hacia el final del cultivo, el contenido en materia seca y la viscosidad sean bajas para que la masa celular sea fácilmente separable, y la cantidad de carbohidratos libres y aminoácidos en el medio sean mínimos.

Las enzimas extracelulares son usualmente producidas en cultivos por lote en ciclos de 30 - 150 hs. Muchos de estos procesos requieren una demanda alta de oxígeno y vigorosa agitación y aireación. El proceso es a menudo finalizado cuando se alcanza la máxima productividad (g/l.h), que no siempre coincide con la máxima producción, para obtener un medio que facilite la recuperación de la enzima. (Aunstrup, 1979).

1.3.2- Sistemas de cultivo de microorganismos.

Los cultivos microbianos pueden ser clasificados en sistemas "abiertos" y "cerrados" (Pirt, 1975). El cultivo continuo, el cual se caracteriza por tener una entrada de nutrientes y una salida de biomasa y otros productos, es un sistema abierto. No así el cultivo por lotes, en el cual todos los nutrientes son introducidos a la vez en el reactor al iniciar la fermentación, correspondiendo a

un sistema cerrado.

1.3.2.1- Cultivos por lote. (CL)

Como describimos anteriormente, un simple cultivo en batch consiste de una cantidad limitada inicial de nutrientes, constituyendo un sistema cerrado. En este caso, la velocidad de crecimiento de la biomasa debe tender a cero, por la falta de un nutriente en el medio o por la acumulación de un producto no tolerado por los microorganismos cultivados. Las diferentes fases de un cultivo por lote reflejan cambios en la biomasa y en el ambiente. Existe una fase de crecimiento exponencial a partir de la cual se puede calcular la velocidad de crecimiento específica máxima de la población ($\mu_{m\acute{a}x}$), la cual representa la afinidad del microorganismo por el nutriente limitante del crecimiento. En esta fase se puede calcular el tiempo de duplicación de la población microbiana (t_d) que alcanza el valor mínimo en esta fase. La velocidad de crecimiento dx/dt aumenta y es proporcional a x , alcanzando un ritmo de crecimiento exponencial, el cual se observa graficando $\log x = f(t)$; μ es constante y máxima en esta fase.

Ecuaciones:

$$\frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} = \mu_m \qquad \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_1 - t_2} = \mu_m$$

siendo x_1 y x_2 valores de biomasa correspondientes a los tiempos t_1 y t_2 .

Cuando $x_2 = 2x_1$:

$$\frac{\ln 2}{t_d} = \mu_m \quad \text{de donde} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu_m}$$

1.3.2.2- Cultivos por lote alimentado. (CLA)

Básicamente, la operación consiste en agregar al fermentador una corriente de alimentación, que contiene uno o más nutrientes y que, al no existir una corriente de descarga, se tiene como consecuencia un aumento continuo del volúmen del medio de cultivo durante toda la fermentación por lote alimentado. Las condiciones iniciales de un cultivo por lote alimentado se logran a través de una etapa previa obligatoria de cultivo por lote.

Podemos observar en cultivos alimentados, que la velocidad con que las células utilizan el nutriente limitante es proporcional a la velocidad específica de crecimiento de las mismas (μ), a la concentración celular (X) y al volúmen del cultivo V , definidos en un instante, e inversamente proporcional al rendimiento en células del sustrato limitante (Y).

Esta velocidad de consumo corresponde a una demanda de nutrientes y se puede representar por la siguiente expresión:

$$\text{velocidad de consumo} = \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{x/s}} \quad (\text{g/h})$$

No vamos a desarrollar el tema en este capítulo, puesto que la técnica no fue utilizada en esta tesis, sin embargo vamos a plantear más adelante las diferencias y conveniencias del CLA con el cultivo continuo (CC).

1.3.2.3- Cultivo continuo.

El cultivo continuo de microorganismos nos permite separar y definir parámetros, como la velocidad de crecimiento específica, la concentración celular y la composición del medio donde se desarrolla el cultivo. Estos parámetros no cambian con el tiempo en un cultivo continuo, mientras que en cultivos por lote, cambian continuamente. Para los científicos que investigan la forma microbiana, función o dinámica poblacional, el cultivo continuo es una herramienta invaluable. Para los ingenieros preocupados en optimizar la producción de biomoléculas a escala industrial, el control de estos parámetros puede ser traducido en un incremento de la productividad que supere la fermentación por lotes.

Una población microbiana puede adaptarse a un ambiente; esta adaptación causa una modificación del ambiente, la cual provoca una nueva adaptación, en un ciclo que culmina en la inanición y muerte, o en la esporulación y detención del crecimiento. En ausencia de selección genética, la fermentación continua permite obtener una población celular que permanece indefinidamente en un ambiente que no cambia. En un quimiostato, el

crecimiento celular está limitado por un nutriente seleccionado (nutriente limitante). Así, la velocidad con el cual el medio abastece al fermentador, determina la velocidad de crecimiento del microorganismo y, la concentración del nutriente limitante en la alimentación, determina la densidad celular del cultivo.

El cultivo continuo es usualmente comenzado como un cultivo en lote. La alimentación es provista con un flujo F , expresado en ml/h. El volúmen del fermentador V es mantenido por remoción controlada del medio crecido. Las células crecen hasta que el nutriente seleccionado es limitante. Después de esto, el crecimiento celular es limitado por la velocidad de adición del medio (Pirt, 1975).

Considerando la biomasa producida, la que sale y la que se acumula en el fermentador, podemos describir un balance de materia sobre la biomasa, como:

alimentación - salida + crecimiento - muerte = acumulación

$$\frac{F}{V} \cdot x_0 - \frac{F}{V} \cdot x + \mu x - \alpha x = \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

El primer término se anula por lo que la entrada de medio al fermentador es estéril.

$\alpha x \ll \mu x$; por consiguiente:

$$\boxed{\frac{dx}{dt} = \mu x - \frac{F}{V} \cdot x} \quad (2)$$

En estado estacionario:

$$x \text{ es constante} \Rightarrow \frac{dx}{dt} = 0 \Rightarrow \mu = \frac{F}{V}$$

$$\boxed{D = \frac{F}{V} = \mu} \quad (3)$$

De la misma manera, el balance para el sustrato limitante del crecimiento se expresa como:

alimentación - salida - sustrato para - sustrato para - formación = acumulación
crecimiento mantenimiento de producto

$$\frac{F}{V} \cdot S_0 - \frac{F}{V} \cdot S - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} - m_x - \frac{Q_p x}{Y_{p/s}} = \frac{ds}{dt} \quad (4)$$

Los términos correspondientes al mantenimiento celular y a la formación de producto se consideran despreciables.

En estado estacionario:

$$S = \text{constante} \Rightarrow \frac{ds}{dt} = 0; \quad \frac{F}{V} = D$$

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \quad \text{y como } \mu = D \Rightarrow \boxed{X = Y_{x/s} \cdot (S_0 - S)} \quad (5)$$

Para poder aplicar la ecuación (5), es necesario hacer algunas suposiciones:

a) Se asume que el rendimiento es independiente de la velocidad de dilución. Esto es válido solo como aproximación porque el rendimiento sí puede variar en un amplio rango de velocidades de dilución.

b) El valor absoluto de la concentración celular (x) se asume que es independiente de todos los nutrientes, excepto del limitante.

c) El rendimiento en células del nutriente limitante es afectado únicamente por el nutriente limitante en consideración.

Estas dos últimas consideraciones, aproximadamente se cumplen cuando el quimiostato es operado en exceso de todos los nutrientes excepto uno, y cuando los factores tales como pH, temperatura, y oxígeno disuelto son mantenidos constantes.

Las ecuaciones (3) y (5) para el estado estacionario en cultivo continuo, nos muestran la relación que existe entre la velocidad de dilución y la velocidad específica de crecimiento, la primera y entre la biomasa, el rendimiento y el sustrato limitante, la otra.

El modelo de Monod, puede aplicarse para relacionar las variables D , x , Y y S en una sola ecuación.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (6)$$

K_s = concentración de sustrato S cuando la velocidad específica de crecimiento μ es igual a la mitad de μ_m .

Este modelo asume que la velocidad de crecimiento es función **únicamente** de la concentración del sustrato limitante, independientemente de la concentración de otros nutrientes y otros factores ambientales.

Si la ecuación (6) es aplicada al cultivo continuo:

$$D = D_c \frac{S}{K_s + S} \quad (7)$$

D_c : velocidad de dilución crítica, lo que representa la máxima velocidad a la que un quimiostato puede ser operado, que salvo excepciones corresponde a la máxima velocidad de crecimiento en un cultivo por lotes.

1.3.2.4- Discusión acerca de la conveniencia de la utilización de los métodos antes descritos.

En general, el CLA resulta ventajoso sobre el tradicional cultivo por lotes cuando es necesario efectuar un cierto control sobre la velocidad específica de crecimiento (μ). En el CLA, ésto se logra mediante la corriente de alimentación, controlando la disponibilidad del nutriente limitante dentro del fermentador.

Esta flexibilidad del CLA permite su aplicación en la producción tanto de

metabolitos secundarios como metabolitos primarios. El CLA resulta adecuado también para procesos limitados por la existencia de represión catabólica, inhibición por sustrato y constante de saturación (K_s) muy alta (Mao, 1992; Giesecke, 1991). En todos estos casos se esperaría encontrar mayores productividades en un CLA que en un cultivo por lotes.

Los ejemplos citados anteriormente son adecuados también para ser realizados en cultivo continuo, modalidad en que se logra un adecuado control del estado fisiológico de la célula, apto para la producción de un determinado metabolito, a lo cual se debe sumar su mejor productividad por ser un proceso continuo. Sin embargo no goza a nivel industrial de una merecida popularidad, lo que parece deberse al grado de complejidad que involucra la operación, los riesgos de mutación con la consecuente pérdida de la cepa original y la aparición de un contaminante que se adapte mejor que la cepa de producción.

Otra razón podría ser que en algunos casos, a pesar de la alta productividad, la concentración de producto en la corriente de salida sea tan baja, que la etapa de recuperación afecte el proceso más allá de toda conveniencia en el costo de producción. De todas maneras, la técnica de cultivo continuo se aplica para estudiar la regulación de la síntesis de enzimas, como herramienta de selección de microorganismos (Pazlarová, 1988; Lelieveld, 1982), combinado con otra técnica de cultivo para la producción continua de enzimas (Jensen, 1972), e innumerables aplicaciones.

OBJETIVOS.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- El aislamiento a partir de fuentes naturales de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*, con capacidad de producir proteasas.
- 2.- La caracterización microbiológica de la cepa seleccionada, utilizando criterios morfológicos y bioquímicos, internacionalmente aceptados.
- 3.- Realizar estudios de producción de proteasas en cultivos por lote y continuo, con el fin de estudiar los parámetros físicoquímicos (pH, temperatura) y componentes del medio de cultivo que afectan la producción de proteasas; además dilucidar los mecanismos regulatorios que gobiernan la síntesis de estas enzimas.
- 4.- Por último, aumentar la actividad específica de las proteasas obtenidas por métodos de purificación, para determinar parámetros óptimos de la actividad enzimática como: pH, temperatura, estabilidad térmica, efecto de inhibidores, etc..

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- RELEVAMIENTO DE CEPAS PRODUCTORAS Y CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.

2.1.1.- Técnicas de aislamiento.

Se parten de muestras seleccionadas de diferentes fuentes naturales (tierra, agua, efluentes, etc..) potencialmente poseedoras de microorganismos productores de proteasas, y se procede al aislamiento de los mismos siguiendo el esquema propuesto en la **Figura 1**.

Las muestras fueron tratadas para seleccionar cepas esporoformadoras del Género *Bacillus*. Para ello 1,0 g o 1,0 ml de muestra, dependiendo de la procedencia de la misma, fue resuspendida al 1,0 % en NaCl 0,85 % y calentada a 80 °C por 10 minutos. Alícuotas de estas muestras fueron sembradas en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio agar-leche el cual contiene 1,0 % de leche descremada y 1,5 % de agar, para seleccionar cepas proteolíticas. Las colonias productoras de proteasas fueron aisladas a partir de estas placas y cultivadas en medio sintético líquido de Zhang (1983) modificado, conteniendo 1,0 % de caseína, a pH 7-7,5.

Posteriormente se realizó un aislamiento de cepas alcalófilas en el mismo medio líquido, alcalinizado a pH 8-9 con NaOH 1,0 N. Todos los aislamientos fueron realizados a temperaturas entre 45 y 55 °C, para seleccionar cepas termorresistentes.

Se tomó como criterio de selección de cepas proteolíticas al diámetro del halo de clarificación del medio que circunda la colonia en relación con el tamaño de la colonia productora (Figura 2a), en una placa de agar leche. Esta relación fue definida como productividad y fue comparada con la producida por una cepa de colección, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, utilizada como control positivo.

Las mejores cepas, en cuanto a su productividad en placa, fueron elegidas para realizar los estudios preliminares de crecimiento microbiano y producción de proteasas en cultivos por lote en Erlenmeyers.

2.1.2.- Medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo líquidos tuvieron la composición del medio sintético Zhang, el cual se detalla a continuación. Se utilizó caseína como fuente de carbono, suplementándose en algunos casos con 0,05 % de extracto de levadura, definiéndose así el medio sintético mínimo (MM) y suplementado (MS), respectivamente.

La composición de sales en grs/l del medio sintético Zhang fue la siguiente:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,00
Na_3 citrato.....	1,00
KH_2PO_4	3,00

K_2HPO_4	6,00
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	0,01
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,05
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,01

Los ensayos de productividad en placas de Petri se realizaron en medio MM adicionando leche descremada al 1,2-1,5 % y agar-agar (Merck) al 1,5 %.

Figura 2a: Aislamiento de cepas productoras de proteasas en placas de agar-leche.

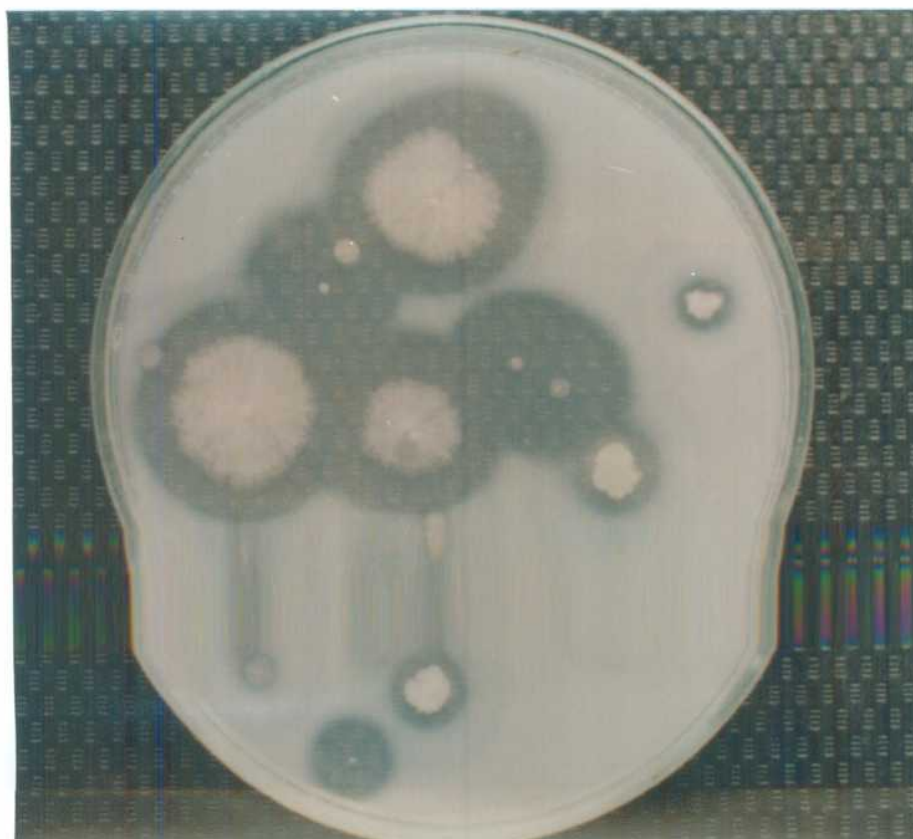
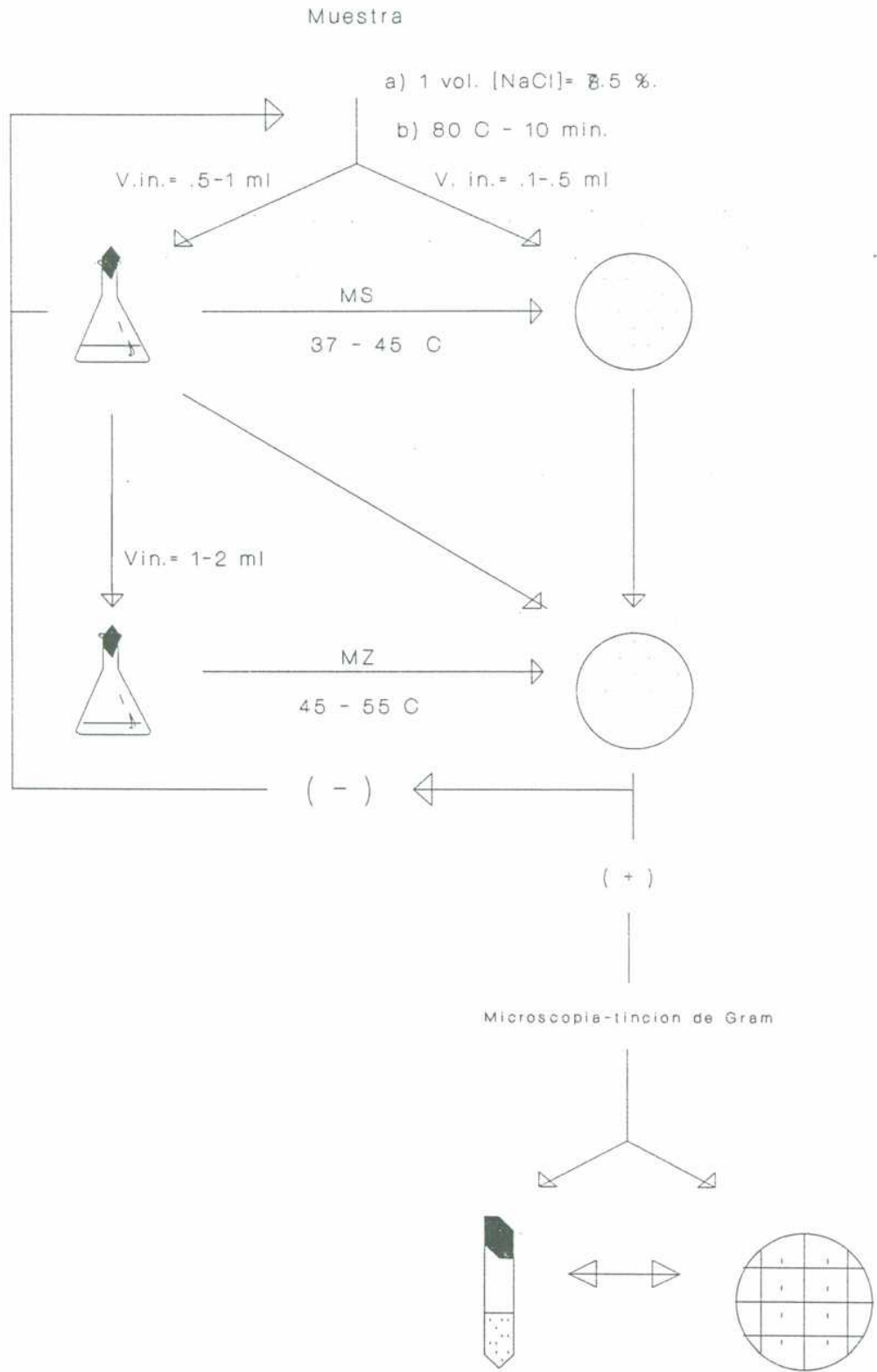


Figura 1: Esquema de aislamiento de cepas.



2.1.3.- PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DE LA CEPA AISLADA.

2.1.3.1- Degradación de aceite de oliva.

La actividad degradativa sobre el aceite de oliva fue ensayada empleando el siguiente medio de cultivo, expresado en g/l: solución A, compuesta por peptona 5,0; extracto de levadura 3,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1; agar 15,0 disueltos en 500 ml de agua destilada; solución B, compuesta por una emulsión de aceite de oliva en agua destilada al 2,0 %. Ambas soluciones se mezclan en partes iguales después de la esterilización.

Las placas así preparadas presentan turbidez característica debido al aceite emulsionado; la aparición de halos traslúcidos en torno de las colonias se considera señal de degradación del aceite.

2.1.3.2.- Degradación de ADN.

Para este ensayo se empleó el siguiente medio de cultivo expresado en g/l: triptona 20,0; NaCl 5,0; ácido desoxirribonucleico (ADN) 2,0 y agar 15,0.

La actividad degradativa se detecta agregando verde de metilo (intervalo de viraje: 4,2 a 6,3 unidades de pH) al medio de cultivo en una concentración de 5,0 g/l.

Se considera un resultado positivo, a la formación de halos claros alrededor de las colonias, en contraste con el medio que permanece de color verde (Smith y col., 1969).

2.1.3.3.- Degradación de almidón.

La detección de actividad amilolítica en placa se realizó en medio MS adicionado con 1,0 % de almidón soluble. El revelado se efectuó mediante alguno de los procedimientos siguientes:

- revelado en frío: se dejan las placas a 5 °C durante 36 a 48 hs.

produciéndose la precipitación del almidón, la placa adquiere color blanco. Las colonias con actividad amilolítica presentan un halo transparente.

- revelado con solventes: se cubre la placa con etanol 95 % produciéndose la precipitación del almidón en 30 min., a temperatura ambiente. La reacción es positiva cuando aparecen halos claros.

- revelado con solución de lugol: la interacción entre soluciones de lugol ($[I_2] = 2,0 \text{ g/l}$, $[KI] = 20,0 \text{ g/l}$) y almidón, produce complejos de color azul. La ausencia de coloración alrededor de las colonias indica degradación del polímero.

2.1.3.4.- Degradación de carboximetilcelulosa (CMC).

Los ensayos degradativos sobre este polímero se realizaron empleando el medio de cultivo cuya composición en g/l se detalla a continuación: peptona 5,0; extracto de levadura 3,0; NaCl 2,0; CMC 10,0 y agar 15,0. El revelado de las placas se efectuó cubriéndolas con una solución acuosa de rojo Congo (2,0 g/l) y dejándolas durante 5 min. a temperatura ambiente. Luego de descartar el sobrenadante, se lava dos veces con una solución de NaCl 1,0 M.

Se considera un resultado positivo, la presencia de un halo traslúcido alrededor de la colonia, el cual contrasta con el color rojizo del resto de la placa (Skipper y col., 1985).

2.1.3.5.- Degradación de caseína.

La degradación de caseína se ensayó en el medio que se detalla a continuación, y cuya composición es expresada en g/l: peptona 5,0; extracto de levadura 3,0; NaCl 1,0; caseína 10,0 y agar 15,0. El medio tiene apariencia opaliciente, y la presencia de halos de clarificación alrededor de las colonias se considera un resultado positivo (Claus y col., 1986).

2.1.3.6.- Licuación de gelatina.

Los ensayos de licuación de la gelatina se realizaron en tubos de ensayo con medio agarizado inclinado cuya composición es la siguiente, expresada en g/l: extracto de levadura 3,0; peptona 5,0; gelatina 4,0 y agar 15,0. Los tubos se incubaron a 30 °C por 48 a 72 hs y el resultado se considera positivo cuando se produce la licuefacción del medio agarizado, a temperatura ambiente.

2.1.3.7.- Degradación de poli-oxietilen sorbitanos.

Los ensayos de degradación de monolauratos y monooleatos de poli-oxietilén sorbitanos (comercialmente conocidos como Tween 20 y Tween 80, respectivamente) se realizaron en el siguiente medio, expresado en g/l: peptona 5,0; extracto de levadura 3,0; NaCl 2,0; CaCl₂ · 2H₂O 2,20; Tween 10 ml/l y agar 15,0.

La aparición de precipitados blancos alrededor de las colonias es considerada reacción positiva y la misma se debe a la formación de complejos entre ácidos grasos liberados presentes en el medio de cultivo y Ca²⁺.

El revelado se efectuó cubriendo la superficie de las placas con lugol, dejando 1 min y descartando el líquido remanente. Esta técnica aumenta la sensibilidad del ensayo clásico (Sierra, 1957), probablemente debido a la

formación de complejos entre I^{-} y Ca^{2+} libres.

2.1.3.8.- Degradación de pululano.

Las pruebas de degradación de pululano se efectuaron en el medio de cultivo que se detalla a continuación en g/l: triptona 2,0; extracto de levadura 2,0; NaCl 2,0; pululano 10,0 y agar 15,0. El revelado de las placas se efectuó agregando etanol 95 % y dejándolo 30 min. a temperatura ambiente, produciéndose así la precipitación del polímero. Las colonias que se encuentren rodeadas de halos transparentes se consideran como degradadoras de pululano (Morgan, y col., 1979).

2.1.3.9.- Degradación de urea.

Los ensayos de degradación de urea se realizaron en el medio que se detalla a continuación y que se expresa en g/l: peptona 1,0; D-glucosa 1,0; NaCl 2,0; KH_2PO_4 2,0; urea 20,0; extracto de levadura 0,1; rojo de fenol 0,01 y agar 15,0.

La hidrólisis de urea produce la alcalinización del medio de cultivo provocando el viraje del indicador ácido-base (6,4-8,2 de color amarillo a color rosado-rojo (Mac Faddin, 1980) al color rojo.

2.1.3.10.- Ensayos de tolerancia al NaCl.

Los ensayos de tolerancia fueron realizados en caldo nutritivo suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (20,0; 50,0; 70,0 y 100 g/l). La presencia de crecimiento microbiano indica un resultado positivo.

Los tubos fueron incubados a 37 °C por 48 a 72 hs., luego del cual fueron realizadas las lecturas correspondientes.

2.1.3.11.- Crecimiento microbiano a diferentes pHs del medio.

Los diferentes pH se ensayaron empleando soluciones de HCl 1,0 M y NaOH 1,0 M, las cuales ajustaron el caldo nutritivo a los pH deseados, antes de su esterilización por autoclave. Los tubos fueron incubados a 37 °C y el crecimiento microbiano fue observado a las 48 y 96 hs.(Priest, 1988).

2.1.3.12.- Otros ensayos de caracterización.

2.1.3.12.1.- Crecimiento anaeróbico.

El crecimiento en ausencia de oxígeno fue ensayado en un medio reductor el cual, expresado en g/l está compuesto por: triptosa 20,0; D-glucosa 10,0; NaCl 5,0; tioglicolato de sodio 15,0; extracto de levadura

15,0. El medio se distribuyó en tubos de ensayo y, luego de sembrarlos con la cepa a ensayar, se cubrió la superficie con parafina. La aparición de turbidez en el medio de cultivo fue observada a los 7 días de incubación a 37 °C, siendo indicativa de crecimiento microbiano en ausencia de oxígeno.

2.1.3.12.2.- Crecimiento en agar Mac Conkey.

El ensayo se desarrolló en un medio cuya composición en g/l fue la siguiente: peptona 20,0; NaCl 5,0; lactosa 10,0; sales biliares 1,5; rojo neutro 0,03; cristal violeta 0,001 y agar 13,5. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 hs, considerando señal positiva la aparición de colonias (Gordon, 1977).

2.1.3.12.3.- Desaminación de fenilalanina.

El medio empleado en este ensayo tiene la siguiente composición, expresada en g/l: D-L fenilalanina 2,0; extracto de levadura 3,0; NaCl 5,0; Na₂HPO₄ 1,0 y agar 15,0. Alícuotas de 4,0 ml de este medio de cultivo fueron colocados en tubos de ensayo, dejándolos solidificar en forma inclinada.

Los tubos inoculados fueron incubados a 37 °C por 24 a 48 hs. El revelado se efectuó agregando 4 ó 5 gotas de solución de FeCl₃ (120 g/l) en HCl concentrado (2,5 % v/v). La aparición de color verde brillante en la

superficie del medio de cultivo se considera señal positiva (Mc Faddin, 1980).

2.1.3.12.4.- Ensayo de catalasa.

La presencia de catalasa en algunas bacterias se observa en un ensayo que sigue el siguiente protocolo: una alícuota de 0,1 ml de un cultivo microbiano líquido fue colocado en un portaobjetos, al cual se le agregaron posteriormente 2 gotas de H_2O_2 (30,0 % v/v).

La producción de microburbujas, debido a la producción de O_2 , indica actividad de catalasa (Mc Faddin, 1980).

2.1.3.12.5.- Producción de dihidroxiacetona.

La prueba se realizó en un medio cuya composición en g/l es la siguiente: triptona 5,0; extracto de levadura 15,0; K_2HPO_4 3,0; glicerol 20,0 ml y agar 15,0.

Las placas sembradas fueron incubadas a 37 °C por 48 a 72 hs.. El revelado fue efectuado con una solución compuesta en g/l por: $CuSO_4$ 35,0; tartrato de sodio y potasio 173,0 e NaOH 50,0. Las placas se dejan a temperatura ambiente por 15 min. y se leen los resultados. La aparición de un halo rojo en torno al crecimiento celular fue considerado un resultado positivo.

2.1.3.12.6.- Producción de gas.

La producción de gas a partir de la fermentación de glucosa se observó en un medio de cultivo con la siguiente composición en g/l: peptona 10,0; extracto de carne 1,0; NaCl 5,0 y D(+)-glucosa 10,0. Alícuotas de 5,0 ml de este medio fueron distribuidos en tubos de ensayo conteniendo tubos de Durham, incubando a 37 °C por 24 a 48 hs. luego de ser sembrados. La formación de burbujas en los tubos de Durham es considerada resultado positivo para la producción de gas a partir de glucosa.

2.1.3.12.7.- Producción de indol.

La prueba se desarrolló en un medio cuya composición en g/l se detalla: peptona de caseína 20,0 y NaCl 5,0.

Los tubos de ensayo conteniendo 5,0 ml de este medio fueron inoculados e incubados a 37 °C por 48 hs.. Posteriormente fue retirada una alícuota de 2,0 ml para el revelado, el cual consistió en el agregado de 5 gotas de un reactivo compuesto por 10,0 g de p-dimetilaminobenzaldehído disuelto en 200 ml de una solución compuesta por n-butanol y HCl concentrado en proporción 3:1.

La formación de un anillo rojo en la fase alcohólica se considera como resultado positivo del ensayo (Mc Faddin, 1980).

2.1.3.12.8.- Reacción de Voges Proskauer - Rojo de Metilo.

La reacción evidencia la producción de acetil metil carbinol. La reacción fue desarrollada en un medio que contiene en g/l: peptona 7,0; D(+) -glucosa 5,0; K_2HPO_4 5,0 y KH_2PO_4 2,5. Alícuotas de 5,0 ml del medio fueron distribuidos en tubos de ensayo, los que fueron sembrados y se incubaron a 37 °C por 48 a 72 hs.

El revelado fue realizado sobre una alícuota de 2,5 ml de cultivo por el agregado de los siguientes reactivos, en el orden en que se detallan: 0,6 ml de α -naftol (50,0 g/l) empleando etanol absoluto como solvente; 0,2 ml una de solución de K(OH) (40 %), agitando. Transcurridos 10 a 15 min. se observa el color producido. La formación de color rojo es considerada señal positiva del ensayo de Voges-Proskauer. El ensayo de Rojo de Metilo se realizó luego de 72 hs. de cultivo. A una alícuota de 2,5 ml de cultivo se le agregan 5 gotas de una solución alcohólica del indicador rojo de metilo (3,0 g/l). El viraje del mismo de rojo a amarillo se considera resultado positivo de la reacción. (Mc Faddin, 1980).

2.1.3.12.9.- Reducción de nitratos.

En este ensayo se manifiesta la capacidad de la cepa de reducir nitratos a nitritos e incluso a N_2 . Se empleó para dicho ensayo un medio de cultivo de

la siguiente composición en g/l: extracto de carne 3,0; peptona 5,0 y KNO_3 1,0.

La reacción fue seguida en cultivos realizados en tubos de ensayo incubados a 37 °C por 12 y 24 hs.. La reducción de nitratos fue evidenciada agregando 1 ml de solución conteniendo α -naftilamina (0,5 %), dimetil- α -naftilamina (0,6 %), adicionando a continuación 1 ml de una solución de ácido p-aminobenzenosulfónico (8,0 g) en ácido acético 5,0 M. La aparición de color rojo se considera reacción positiva de reducción de nitratos. (Gordon, 1977). La formación de gases indica N_2 libre.

2.1.3.12.10. Utilización de citrato.

La utilización de citrato como fuente de carbono fue ensayada en un medio con la siguiente composición en g/l: MgSO_4 0,2; $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_2$ 1,0; K_2HPO_2 1,0; citrato de sodio 2,0; NaCl 5,0; azul de bromotimol 0,08 y agar 15,0. El crecimiento microbiano fue seguido en placas de Petri incubadas a 37 °C por 24 a 48 hs. La aparición de color azul alrededor de las colonias indica la utilización del citrato (Bailey, y col. 1966).

2.1.3.12.11. Sistema API 50 CH.

El fundamento de este sistema de caracterización microbiana se basa en

la capacidad de los microorganismos de metabolizar diferentes hidratos de carbono. Para ello se emplean 50 celdas, cada una de las cuales contiene una fuente de carbono determinada y el indicador ácido-base rojo de fenol (intervalo de viraje: 6,4- 8,2). Cada celda se siembra con una alícuota de una concentración aproximada de 10^9 células/ml y se incuban a $37\text{ }^\circ\text{C}$, realizando lecturas a las 12, 24, 36 y 48 hs.. La utilización de la fuente de carbono por el microorganismo en estudio, conduce a la acidificación del medio de cultivo produciendo viraje del indicador.

2.1.3.12.12. Ensayo de sensibilidad a antibióticos.

Los ensayos se efectuaron en placas de Petri con 20,0 ml de agar Müller-Hinton y se sembraron por rastrillado alícuotas de 0,1 a 0,2 ml provenientes de cultivos con 12 hs. de crecimiento, cuyas densidades ópticas fueron aproximadamente 0,5-0,75 a 560 nm.

Se ensayaron cinco antibióticos por placa, utilizando discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro embebidos en ellos, mantenidos a temperatura ambiente por 30 min. A continuación las placas fueron incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 a 18 hs., determinando el diámetro promedio de la zona de inhibición alrededor de los discos.

La resistencia o sensibilidad de las cepas a los diferentes antibióticos fue establecida de acuerdo a criterios de la Organización mundial de la Salud

(boletín O.M.S., 1977). Para cada cepa ensayada, las pruebas se realizaron por duplicado.

Se aplicó un tratamiento estadístico que es utilizado para la identificación probabilística de grupos y especies muy relacionados. Uno de los parámetros más difundidos es el coeficiente de similitud (S_j) (Colwell, y col., 1981), que se define como: $S_j = \alpha / \alpha + \beta + \sigma$

En donde α es el conjunto de reacciones positivas en las cepas a comparar, β y σ son los conjuntos de reacciones que presentan caracteres positivos para una de las cepas y negativos para las restantes.

2.2.- ESTUDIOS DE PRODUCCION DE PROTEASAS.

2.2.1.- Microorganismo. Pureza del cultivo. Conservación de la cepa.

Los estudios de producción de proteasas, fueron inicialmente dirigidos a las proteasas alcalina y neutra, cuyas actividades fueron encontradas en la cepa MIR 29. Posteriormente, los estudios continuaron hacia la obtención de actividad de proteasa alcalina, solamente, considerando que era la actividad de proteasa preponderante en esta cepa y de gran aplicación en la industria detergiva.

La pureza del cultivo fue controlada por repiques en medio agar-leche, observando el mantenimiento de su productividad en placa, por observaciones

microscópicas y tinción de Gram.

La cepa fue conservada por varios métodos:

- 1- en tubos eppendorf con 20 % de glicerol en agua, guardados a -20 °C, preparados a partir de un cultivo en medio con caseína al 1,0 % cosechado en fase exponencial.
- 2- como suspensión de esporas en agua destilada guardadas en tubos Eppendorf a 4 °C, a partir de un cultivo con esporulación avanzada.
- 3- en tubos con medio rico agarizado, donde la siembra de la cepa fue por punción, almacenados a temperatura ambiente.

La primera forma de conservación fue la más utilizada, ya que a partir de cada tubo Eppendorf se hacía el inóculo para los distintos ensayos ya sea en cultivos por lote y continuo. Los dos métodos restantes sirvieron para conservar la cepa en caso de cualquier inconveniente con la conservación en glicerol.

2.2.2.- Medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo líquidos tuvieron la composición de sales del medio sintético Zhang, el cual fue detallado en el ítem **2.1.2. Técnicas de aislamiento.**

Como fuentes de carbono se utilizaron: caseína (Sigma Chemical Co.), almidón (Merck), glucosa anhidra (Merck) y glicerol (Mallinckrodt Chem.

Works), en concentraciones detalladas en cada experimento. Como fuentes de nitrógeno alternativas fueron utilizadas: urea (ICN Biomedical, Inc.), NaNO_3 (Merck) y peptona de caseína (Merck), en las concentraciones detalladas en los experimentos.

2.2.3.- Condiciones de cultivo.

Los primeros cultivos por lote fueron realizados en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad, agitados en un incubador rotatorio a 200 rpm, a distintas temperaturas (37, 45 y 52 °C), empleando medios de cultivo MM y MS, con caseína 1,0 % como fuente de carbono y pH 7-7,5. Los estudios de producción de proteasas con control de distintos parámetros fueron realizados en un fermentador BIOFLO III (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) de 1,5 L de capacidad con 1,0 L de volumen de trabajo. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura: 45 °C; pH: 7,5 (mantenido con NH_3 1,5 M o NaOH 3 N y H_3PO_4 1,5 M); oxígeno disuelto: 20-40 %; agitación: 350-550 rpm, la cual controla el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio.

La entrada de aire al fermentador se realiza mediante compresor, y el flujo se controla manualmente en un rango de 0,1-2,0 vvm.

El fermentador está equipado con bombas peristálticas para la entrada de antiespumante, ácido, base y medio de cultivo para la alimentación en cultivo continuo. Este último requirió de una bomba adicional para la salida del

cultivo del fermentador, Watson-Marlow 503U con flujo variable.

Se estudió el comportamiento de la cepa en cuanto a su crecimiento y producción de proteasas con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, manteniendo constantes las otras variables fisicoquímicas de fermentación.

La naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas se detallan en cada experimento.

2.2.4.- Crecimiento microbiano.

El mismo fue determinado por turbidimetría a 560 nm en un espectrofotómetro Metrolab 325 (UV-VIS), utilizando como blanco medio de cultivo libre de células. Los valores de absorbancia obtenidos se expresan como densidad óptica del cultivo (DO). Para determinar peso seco, 4,0 ml de cultivo se centrifugó en centrífuga refrigerada a 3.500 rpm por 20 min., se lavó una vez con agua destilada, resuspendió en 4,0 ml de agua y secó posteriormente a 105 °C por 24 hs. Las determinaciones de peso seco fueron realizadas por triplicado y el mismo expresado como gr. de células/l de medio (g./l).

La correlación entre la densidad óptica y el número de células viables fue realizada por gráfica de lecturas de DO en función del N° de células viables, por recuento en placa. Fue determinado el N° células/ml a partir de un cultivo cuyo crecimiento fue seguido en el tiempo. Se correlacionó cada dato

de densidad óptica a 560 nm con el N° de células viables correspondiente a cada punto de la curva. Las determinaciones se realizaron por duplicado construyendo una curva de calibración entre DO 560 nm y N° de células/ml, calculado como N° colonias / dilución x vol.de plaqueo (ml).

2.2.5.- Determinación de actividades enzimáticas.

Las actividades de proteasa alcalina y neutra fueron ensayadas en los sobrenadantes de las muestras tomadas a distintos tiempos del cultivo, obtenidos por centrifugación a 8000 rpm, 8 minutos y definidas como **actividad exocelular**. También fue determinada la **actividad total** en alícuotas del cultivo sin centrifugar, considerando la actividad exocelular más la actividad unida a membrana plasmática.

Para la determinación de proteasa alcalina se utilizó caseína al 1,0 % como sustrato, disuelta en buffer borato 50 mM, pH 10,0 y EDTA 5 mM.

La determinación de proteasa neutra se efectúa con caseína al 1.0 % disuelta en buffer fosfato 200 mM, pH 7,4. La reacción se detiene con TCA 10% en hielo y la caseína no hidrolizada se separa por centrifugación a 10.000 rpm por 8 min.. Los sobrenadantes son transferidos a otros tubos para los ensayos de los productos de la proteólisis.

Ambas actividades enzimáticas fueron determinadas por dos métodos espectrofotométricos distintos.

Uno se basa en medir a 280 nm la absorbancia producida por aminoácidos aromáticos como tirosina, producto de la degradación de la caseína. Se realizó una curva de calibración con tirosina (solución estándar de 1,0 mg/ml) a 280 nm para expresar las absorbancias obtenidas de las muestras como tirosina libre.

El otro método mide los aminoácidos producidos por hidrólisis, como tirosina, con el reactivo de Folin: 0,5 ml de sobrenadante proveniente de separar los productos precipitados con TCA, fueron neutralizados con 2,5 ml Na_2CO_3 0,5 M antes de agregarles 0,5 ml del reactivo de Folin para la reacción colorimétrica. Después de dejar las muestras a temperatura ambiente por 30 min. en oscuridad, se miden en el espectrofotómetro a 660 nm. A partir de las absorbancias obtenidas y la curva de calibración realizada con tirosina se calcula la concentración de la misma liberada por proteólisis. (Anson, 1938)

La unidad enzimática es definida en ambos casos como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μg de tirosina en 30 min a 37 °C.

2.2.6.- Determinaciones bioquímicas.

2.2.6.1.- Determinación de glicerol.

La determinación de glicerol se realizó por HPLC (Gilson, France), en las siguientes condiciones:

-fase móvil: agua bidestilada

-flujo: 0,6 ml/min.

-temperatura: 55 °C

-loop de 20 μ l

El detector es un refractómetro diferencial LKB.

El integrador, SHIMADZU CR601 (Japan).

La columna, PHENOMENEX, tipo Rezex monosaccharide H+,
tamaño: 300 x 7,8 mm; 8 μ .

Los sobrenadantes de las muestras a analizar fueron tratados con TCA al 10 % para precipitar proteínas. La precipitación continuó a 4 °C por 10-15 minutos. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos en una centrífuga Eppendorf y 20 μ l del sobrenadante se inyectó en el equipo.

2.2.6.2.- Cuantificación de almidón

El almidón remanente en el medio de cultivo fue medido con el reactivo de iodo (Smith, B.W. y Roe. J.H., 1949), una solución de I₂/KI (0,2 %, 2,0 %), y se utilizó una solución estándar de almidón soluble de 0,5 mg/ml. Un volúmen del sobrenadante de la muestra se mezcla con buffer fosfato 50 mM hasta volúmen final de 0,2 ml, se agregan 0,2 ml del reactivo de iodo y se llevan los tubos a 2,0 ml con H₂O. Las lecturas fueron hechas a 640 nm y las

concentraciones fueron calculadas mediante una curva de calibración hecha con almidón y expresadas en mg/ml .

2.2.6.3.- Determinación de glucosa.

Se utilizó el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (Trinder, P. 1969), empleando una solución de glucosa 1,0 mg/ml como estándar. Se mezclan 20 μ l de muestra con 2,0 ml de reactivo. El reactivo está compuesto por: GOD/POD (glucosa oxidasa/ peroxidasa) y fenol. La glucosa es oxidada por la GOD a ácido glucónico y H_2O_2 , ésta última en presencia de POD produce la reacción oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona, dando lugar a un cromógeno con absorción máxima a 505 nm.

Se realizó una curva de calibración con la glucosa estándar, con el fin de transformar los valores de absorbancia obtenidos a concentración de glucosa en mg/ml.

2.2.6.4.- Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas exocelulares se realizó por el método de Bradford (Bradford, M.M. 1976). El reactivo se prepara disolviendo Coomassie blue G 250 al 0,06 % en ácido perclórico 0,3 M; la solución se filtra por papel Watmann N° 1. Se utiliza una solución de 1,0 mg/ml de BSA como estándar.

Dependiendo de la cantidad de proteínas que tenga el sobrenadante de la muestra, se diluye la misma con H₂O destilada hasta un volúmen de 0,5 ml y se agrega igual volúmen de reactivo. Las muestras se leen a 595 nm contra blanco de reactivo y con los valores de absorbancia obtenidos y una curva de calibración realizada con BSA (rango: 0 - 50 μ g/ml), se calcula la concentración de proteínas.

2.2.6.5.- Determinación de amonio.

Se utiliza el reactivo de Nessler para la determinación de amonio en el medio.

Reactivo de Nessler: disolver 5,0 gr. de Hgl₂ y 3,5 gr. de KI en una pequeña cantidad de agua y agregar esta mezcla suavemente con agitador a una solución fría de 8,0 gr. de NaOH en 25 ml de H₂O. Diluir a 50 ml y guardar en frasco color caramelo, al abrigo de la luz.

Para la determinación de amonio se colocan 500 μ l de sobrenadante del cultivo (muestra) en un tubo de ensayo. Se agregan 500 μ l de solución al 2 % de goma arábica, 500 μ l de reactivo de Nessler y 3,5 ml de agua destilada. Se mezcla bien y se deja en reposo 30 minutos. La absorbancia se mide a 420 nm contra un blanco de reactivos. La curva de calibración se prepara utilizando 1-30 μ g de nitrógeno / ml como (NH₄)₂ SO₄.

2.2.7.- Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.

El objetivo de estos ensayos es estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono en el momento en el que teóricamente se induce la síntesis de proteasa alcalina. El experimento consiste en cambiar la fuente de carbono del medio, a un cultivo que viene creciendo en almidón al 0,5 %, en el momento en que se espera que la síntesis de proteasa alcalina se induzca. El cultivo original fue hecho en un erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio con 0,5 % de almidón. A un tiempo determinado, especificado en el gráfico, se transfirieron 25 ml del cultivos a erlenmeyers de 250 ml con 25 ml de medio que contiene 0,5 % de caseína, 0,5 % de glucosa o 40 mM de amonio, y se continuó la curva de crecimiento en estos cultivos.

Todos los erlenmeyers fueron incubados a 45 °C en agitación a 200 rpm. A distintos tiempos fueron tomadas muestras para determinar DO del cultivo y actividad de proteasa alcalina.

Un erlenmeyer de 500 ml con medio con almidón al 0,5 % fue tomado como cultivo control, realizando una curva de crecimiento completa con él.

2.2.8.- Condiciones del estado estacionario.

El estado estacionario en cultivo continuo fue alcanzado cuando se

observó que la concentración celular permanecía constante. Esto ocurrió generalmente después de haber transcurrido 4 volúmenes del fermentador (V) o 4 tiempos de retención. Habiendo determinado el flujo de alimentación (F), el tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario sería $4V/F$. Durante el estado estacionario fueron tomadas 2 a 3 muestras, las cuales se promediaron para simplificar los resultados graficados.

2.2.9.- Determinación de D_c y $\mu_{m\acute{a}x}$ en cultivo continuo.

Se determinó por la metodología de Pirt y Callow (Pirt, J., 1975).

Obtenido el estado estacionario a una D determinada, se aumenta el F a fin de producir el lavado del cultivo, siguiendo la disminución de la concentración de biomasa en el tiempo.

De acuerdo a la teoría de cultivo continuo, el balance de biomasa está dado por la expresión:

Incremento neto = crecimiento - salida de biomasa

$$dx = V.\mu.x.dt - F.x.dt$$

$$dx/dt = (\mu - D).x \quad (1)$$

En condiciones de estado estacionario:

$$dx/dt = 0 \quad \text{y} \quad \mu = D$$

Cuando $S \gg K_s$, $\mu = \mu_m$ y la ecuación 1 integrada puede escribirse como:

$$\ln x = (\mu_m - D).t + \ln x_0 \quad (2)$$

Haciendo $D > D_c$ en el quimiostato, la biomasa decrece hasta producirse el lavado del cultivo de acuerdo a la ecuación 2.

La pendiente de la recta que resulta de graficar $\ln x$ en función del tiempo, será igual a $(\mu_m - D)$, lo que posibilita conocer la máxima velocidad específica de crecimiento.

2.2.10.- Ensayos de pulso en cultivo continuo.

Los pulsos en cultivo continuo, cuya composición y concentración se detallan en cada experimento, se realizaron después de haber transcurrido $4 t_R$ a la D fijada. Las muestras fueron tomadas por un período de 4 a 5 h después del pulso, y el cultivo fue dejado entre 8 y 10 h más antes de comenzar a contar otra vez los $4 t_R$. Dos a tres muestras fueron tomadas durante el estado estacionario correspondiente a cada ensayo de pulso.

2.3.- ESTUDIOS ENZIMATICOS.

2.3.1.- Ensayos de purificación enzimática.

Para tales efectos se realizó una purificación parcial de la enzima, utilizando dos compuestos para la precipitación de proteínas: acetona y sulfato

de amonio. Ambos métodos de separación se describen a continuación.

2.3.1.1.- Precipitación con acetona.

200 ml de cultivo proveniente del fermentador fueron centrifugados a 15.000 rpm por 20 minutos en centrífuga refrigerada. El sobrenadante fue mezclado con acetona (Mallinkrot) en balones aforados de 100 ml para conseguir concentraciones de acetona al 30, 40 y 50 %. Los balones fueron conservados a 4 °C durante 16-18 hs.

La mezcla sobrenadante-acetona de cada balón fue separada en dos. Una parte fue centrifugada a 15.000 rpm por 20 minutos, mientras que la otra fue guardada en heladera y denominadas 30A,40A y 50A, refiriéndose a las concentraciones de acetona utilizadas.

Los precipitados obtenidos con acetona (en adelante 30P, 40P y 50P) fueron secados a temperatura ambiente, resuspendidos en 1,0 ml de buffer borato 50 mM, pH: 10,0 y conservados a 4 °C.

2.3.1.2.- Precipitación con sulfato de amonio.

La separación de proteínas fue realizada esta vez, en dos fracciones de 50 ml de sobrenadante de un cultivo, tratándolos con sulfato de amonio al 50 y 70 % de concentración final. La precipitación salina transcurrió en un baño

de hielo con agitación durante 30 min., hasta desaparición de los cristales de la sal. La muestra fue centrifugada a 15.000 rpm por 10 min., a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 5 ml de buffer borato 50 mM, pH: 10,0 y dializado contra el mismo buffer durante 12-16 hs a 4 °C con agitación constante, a fin de eliminar la sal.

La suspensión dializada obtenida fue diluída 3,5 veces para los ensayos enzimáticos descriptos.

2.3.1.3.- Concentración de la actividad proteolítica con CENTRICOM.

Se utilizó CENTRICOM 10, un tamiz molecular que por centrifugación permite separar compuestos de PM < 10 KD. De esta manera, aminoácidos y péptidos menores son separados en el sobrenadante de cultivo.

Dos ml de sobrenadante de cultivo fueron centrifugados a 5000 rpm por 45 minutos en centrifuga refrigerada a 4 °C. El resultado de la centrifugación es la obtención de dos fracciones: una fracción 1 (F₁) conteniendo moléculas de PM < 10 Kd, y fracción 2 (F₂) la fracción enzimática, constituída por moléculas de PM > 10 Kd. Ambas fracciones fueron guardadas a -20 °C para posteriores análisis.

2.3.2.- Determinación de pH óptimo de actividad de proteasa alcalina.

Los ensayos fueron realizados utilizando la suspensión enzimática obtenida de la precipitación salina al 70 % y caseína al 1,0 % como sustrato, disuelta en soluciones reguladoras de diferente pH: Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 0,2 M (5,8- 8,0); borato/HCl 0,05 M (8,1- 9,0); borato/Na(OH) 0,05 M (9,3- 10,7); Na_2HPO_4 /Na(OH) 0,5 M (11,0- 11,9); KCl/Na(OH) 0,2 M (12- 13), con la adición de EDTA 5 mM.

2.3.3.- Determinación de la temperatura óptima de la actividad de proteasa alcalina.

La actividad de proteasa alcalina a 32, 37, 45, 52, 60 y 70 °C fue determinada a diferentes tiempos. El sustrato caseína 1,0 % disuelta en buffer borato 50 mM, pH 10,0 y EDTA 5 mM fue incubada en relación 5:1 con un extracto enzimático parcialmente purificado a cada una de las temperaturas indicadas. A diferentes tiempos fueron tomados 600 μl y mezclados con 400 μl de TCA en un tubo Eppendorf. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado. La caseína precipitada fue separada por centrifugación y la tirosina determinada por el método descripto.

2.3.4.- Estabilidad térmica de la proteasa alcalina.

Un volumen (1 ml) de la suspensión enzimática obtenida por ultracentrifugación con CENTRICOM, fue incubada a 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C en baños termostatzados. A la hora de incubación, a cada una de las temperaturas indicadas, alícuotas de 400 μ l fueron tomados para medir la actividad enzimática remanente. La estabilidad térmica fue expresada como porcentaje de actividad remanente de la actividad proteolítica obtenida a $t = 0$ de la incubación, a las temperaturas mencionadas.

2.3.5.- Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad enzimática.

El efecto de diferentes compuestos químicos sobre la actividad de proteasa alcalina fue observada en una preparación aún más purificada de la enzima. La actividad de proteasa alcalina fue determinada en las condiciones originales de reacción para proteasa alcalina, en presencia de los efectores utilizados en las concentraciones indicadas en la tabla de resultados.

Inhibidores específicos de la actividad proteolítica también fueron ensayados a fin de conocer el tipo de enzima producida.

2.3.6.-Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas menores de 10 Kd.

El efecto de la F_1 sobre la actividad de proteasa alcalina fue ensayada de la siguiente manera: volúmenes crecientes de F_1 fueron mezclados con caseína al 2,0 %, pH 9,8 obteniendo diferentes concentraciones en % (V/V) de F_1 . Este "sustrato combinado" fue utilizado para determinar la actividad enzimática de F_2 . Las condiciones de reacción fueron aquellas utilizadas originalmente para la determinación de proteasa alcalina. Las actividades encontradas con las diferentes concentraciones de F_1 fueron graficadas como % de la actividad remanente respecto de la actividad control.

El desplazamiento de la inhibición con caseína, fue ensayado utilizando aquella concentración de F_1 que inhiba el 50 % de la actividad de proteasa alcalina. Diferentes concentraciones de caseína, especificadas en el gráfico, fueron utilizadas para observar el efecto de la misma sobre el extracto enzimático, en presencia de inhibidor.

2.3.7- Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los ensayos de electroforesis fueron realizados en minigeles de poliacrilamida, de 7 cm de ancho por 8 cm de alto, aproximadamente.

Composición y preparación del gel. La composición es expresada en % v/v final en el gel.

Gel de corrida.

Acrilamida-bis acrilamida 30,0%.....	12,0
Buffer Tris/HCl 1,5 M,pH 8,9.....	25,0
SDS 2.0%.....	0,5
Gelatina 1,0 % en H ₂ O.....	10,0
H ₂ O (d).....	28,0
PSA 10,0 %.....	0,6
TEMED.....	0,2

Gel de concentración.

Acrilamida-bis acrilamida 30,0 %.....	16,8
Buffer Tris/HCl 0,5 M,pH 6,8.....	25,2
SDS 2,0 %.....	0,4
H ₂ O (d).....	56,4
PSA 10,0 %.....	0,8
TEMED.....	0,4

Se sembraron 20 μ l en cada calle de las muestras a testear y 5 μ l de la mezcla de standards y de Alkalase (NOVO Industries) como patrón.

Las muestras provenientes de cultivos con actividad de proteasa alcalina, fueron parcialmente purificadas por ultracentrifugación, con CENTRICOM 10.

El gel fue sometido a una corriente de 11 mA constantes

(aproximadamente 60 V iniciales) durante 1,5 hs. a temperatura ambiente, no observándose calentamiento del mismo.

La renaturalización de las proteínas separadas se realizó sumergiendo el gel en una solución compuesta por buffer Tris/HCl 0,1 M, pH 8,8; CaCl₂ 0,5 % y tritón X-100 2,5 %, durante 1h a 4 °C. Para el revelado de la actividad de proteasa alcalina, se incubó el gel en una solución de buffer Tris/HCl 0,1 M, pH 8,8 y EDTA 5 mM a 45 °C por 2 hs. Posteriormente el gel fue coloreado con una solución al 1,0 % de Amido black en metanol-ácido acético-agua (30:10:60) por 1 h.

La decoloración consistió en varios lavados con una solución de metanol-ácido acético-agua- glicerol (30:10:58:2), hasta visualización de bandas, las cuales aparecían transparentes sobre un fondo azul, debido a la degradación de la gelatina en esa zona. Los geles fueron conservados en ácido acético 7 %.

Marcadores de PM.

	Kd
Albúmina bovina.....	66
Albúmina de huevo.....	45
Glicerol 3-P deshidrogenasa.....	36
Anhidrasa carbónico.....	29
Tripsinógeno.....	24
Inhibidor de tripsina.....	20
α-Lactoalbúmina.....	14

3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. RELEVAMIENTO DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.

3.1.1.- Aislamientos.

A partir de diversas fuentes naturales se aislaron 148 clones en medio sólido con un diámetro de colonia entre 4 y 6 mm, las cuales fueron seleccionadas en medio agar-leche, después de 24-48 hs de crecimiento. Cuando el esquema de aislamiento fue aplicado sucesivamente, se obtuvieron 62 cepas (el 55 % de los aislamientos) con un halo de clarificación, cuyo diámetro, duplicaba el de las colonias, siendo consideradas buenas productoras de proteasas (Figura 2b y 2c). Todas las cepas seleccionadas fueron caracterizadas morfológicamente como pertenecientes al género *Bacillus*.

Las cepa MIR 29, que presentó mayor productividad en estas condiciones, fue caracterizada detalladamente y elegida para realizar los estudios de producción de proteasas en cultivos por lote y continuo.

La pureza de la colonia fue determinada repicando en el mismo medio, y observando que la productividad se mantenía a lo largo de varios repiques. Durante los ensayos, la cepa MIR 29 fue controlada por microscopía y por su patrón de resistencia a antibióticos, verificando que no había sufrido cambios genéticos detectables durante los sucesivos cultivos.

Figura 2b y 2c: Aislamiento de cepas con actividad proteolítica.

2b



2c



La selección de microorganismos de fuentes naturales, es una técnica que constantemente se aplica en los laboratorios de industrias biotecnológicas. Siempre es posible encontrar cepas con nuevas potencialidades, capaces de tolerar condiciones físicoquímicas nuevas o extremas, capaces de sintetizar nuevos productos o con controles metabólicos que permitan obtener mayores productividades que las actuales. A pesar del auge de la ingeniería genética para el mejoramiento de cepas, o el empleo de técnicas de mutagénesis para burlar los controles metabólicos, con el fin de obtener un determinado producto, la selección de microorganismos salvajes sigue siendo una de las herramientas importantes en la búsqueda de nuevos y mejores productos para mejorar la calidad de vida.

3.1.2.- Microscopía.

La cepa *Bacillus* sp. MIR 29 está formada por bacilos Gram positivo a variable, pequeños, esporoformadores y móviles. La spora es terminal o sub-terminal, formando cadenas en cultivos esporulados. Las células vegetativas suelen también encadenarse en etapas de cultivo próximas a la esporulación, observando también otras morfologías del cultivo en diferentes condiciones físicoquímicas del mismo (grumos de células, bacilos encadenados, aspecto filamentoso o enmarañado, etc..)

3.1.3.- Ensayos morfológicos y bioquímicos de la cepa MIR 29.

Morfología de colonia:

1. Rugosa.....+
2. Lisa.....-
3. Rizoidal.....-
4. Opaca.....+
5. Pigmentada.....-
6. Movilidad.....-

Morfología celular:

7. Extremos redondeados.....+
8. Células simples.....+
9. Formación de cadenas.....+
10. Vacuolas.....-
11. Espora oval.....+
12. Espora cilíndrica.....-
13. Espora central.....-
14. Espora terminal.....+
15. Espora deformante.....-

Degradación de:

16. Aceite de oliva.....+
17. ADN.....+

- 18. Almidón.....+
- 19. Caseína.....+
- 20. Carboximetilcelulosa.....+
- 21. Gelatina.....-
- 22. Pululano.....+
- 23. Tween 20.....+
- 24. Tween 80.....+
- 25. Urea.....-

Crecimiento:

- 26. pH= 5,7.....+
- 27. pH= 6,8.....+
- 28. 5 °C.....-
- 29. 10 °C.....-
- 30. 30 °C.....+
- 31. 40 °C.....+
- 32. 50 °C.....+
- 33. 55 °C.....+
- 34. 65 °C.....-
- 35. NaCl (2,0 %, p/v).....+
- 36. NaCl (5,0 %, p/v).....+
- 37. NaCl (7,0 %, p/v).....+
- 38. NaCl (10,0 %, p/v).....+

Otros ensayos:

- 39. Gram positivo.....+

- 40. Gram variable.....+
- 41. Catalasa.....+
- 42. Crecim. anaeróbico.....+
- 43. Crecim. en Mac Conkey.....+
- 44. Producción de DHA.....-
- 45. Producción de indol.....-
- 46. Producción de gas (glucosa)...-
- 47. Reducción de nitratos.....+
- 48. Utilización de citrato.....-
- 49. Voges-Proskauer.....-
- 50. pH en VP= 6.....-
- 51. pH en VP= 7.....+
- 52. Rojo de Metilo.....+

Ensayos bioquímicos empleando el sistema API 50 CH en la cepa
MIR 29.

Utilización de

- 1. Adonitol.....-
- 2. Almidón.....+
- 3. Amigdalina.....+
- 4. D-Arabinosa.....-
- 5. L-Arabinosa.....+
- 6. D-Arabitol.....-
- 7. L-Arabitol.....-
- 8. Arbutina.....+
- 9. Celobiosa.....+

10. Eritritol.....-
11. Esculina.....+
12. D-Fructosa.....+
13. D-Fucosa.....-
14. L-Fucosa.....-
15. Galactosa.....+
16. β -Gentobiosa.....+
17. Glicerol.....+
18. Glucógeno.....+
19. Gluconato.....+
20. 2,Ceto-gluconato.....-
21. 5,Ceto-gluconato.....+
22. D-Glucosa.....+
23. N-Acetil-glucosamina.....+
24. Ó-Metil-D-glucósido.....+
25. Inositol.....+
26. Inulina.....+
27. Lactosa.....+
28. D-Lixosa.....-
29. Maltosa.....+
30. Manitol.....+
31. D-Manosa.....+
32. Ó-Metil-D-manósido.....-
33. Melibiossa.....+
34. Melezitosa.....+
35. D-Rafinosa.....+

- 36. Ramnosa.....+
- 37. Ribosa.....+
- 38. Sacarosa.....+
- 39. Salicina.....+
- 40. Sorbitol.....+
- 41. L-Sorbosa.....+
- 42. D-Tagatosa.....+
- 43. D-Turanosa.....+
- 44. Trehalosa.....+
- 45. Xilitol.....-
- 46. D-Xilosa.....+
- 47. L-Xilosa.....-
- 48. β -Metil-xilósido.....-

Símbolos: - y + resultados negativos y positivos respectivamente, en la utilización del carbohidrato.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos.

Antibiótico	Cepa		
	MIR 29	Subt.	Lich.
1. Ampicilina (10).....	R.....	S.....	S
2. Carbenicilina (100).....	S.....	S.....	S
3. Cefalosporina C (30).....	S.....	S.....	S
4. Cefotaxima (30).....	S.....	S.....	S
5. Ceftazidina (30).....	R.....	R.....	R

6. Ceftriaxona (30).....	S.....	R.....	S
7. Cefuroxima (30).....	S.....	S.....	S
8. Clindamicina (2).....	R.....	S.....	R
9. Eritromicina (15).....	R.....	S.....	R
10. Gentamicina (10).....	S.....	S.....	S
11. Mezlocilina (75).....	S.....	S.....	S
12. Norfloxacina (10).....	S.....	S.....	S
13. Penicilina (6).....	R.....	R.....	R
14. Rifampicina (5).....	S.....	S.....	S
15. Ticarcilina (75).....	S.....	R.....	S

Abreviaturas: R, resistencia; S, sensibilidad; Subt., *B. subtilis* ATCC 6633; Lich., *B. licheniformis*

Coeficientes de Jacquard (S_j).

<i>B. subtilis</i>	0,717
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,703
<i>B. pumilus</i>	0,623
<i>B. licheniformis</i>	0,758
<i>B. circulans</i>	0,742
<i>B. polymyxa</i>	0,672
<i>B. macerans</i>	0,681
<i>B. coagulans</i>	0,548
<i>B. pantothenicus</i>	0,600

El perfil de resistencia a antibióticos no sólo ayudó a la caracterización de la cepa aislada, sino que también se utilizó en el seguimiento de la pureza del cultivo, sobre todo en los ensayos de cultivo continuo, en los cuales es común la aparición de mutaciones en un reactor trabajando varios días. Este sistema de diferenciación de cepas, también se aplica a todas las cepas de *Bacillus* productoras de enzimas exocelulares que estudiamos en el laboratorio (Castro, 1991).

Con todos los resultados de caracterización realizados, podemos concluir que la especie *Bacillus licheniformis* es la que más se aproxima a la cepa MIR 29. Dicho en otras palabras, existe un 75,8 % de similitud entre *B. licheniformis* y nuestra cepa de estudio, y éste es el mayor porcentaje de similitud obtenido con nuestros ensayos de caracterización.

Los problemas para clasificar nuevas cepas aisladas pertenecientes al género *Bacillus*, se complican por la variabilidad de este género, demostrada en la amplia gama de ambientes en que pueden desarrollarse, adaptándose a condiciones muy diversas y hasta extremas. Uno de los problemas más comunes en la definición de género surge del hecho que la esporulación depende de las condiciones bajo las cuales el cultivo es testeado. Otro problema en la clasificación de cepas es la reacción de Gram. Algunas cepas son Gram positivas, mientras que otras adoptan un Gram variable, criterio que es utilizado en la clasificación de bacterias aisladas pertenecientes a este

género (Priest, 1981).

El grupo básico en la taxonomía bacteriana es la especie, aunque la definición de una especie bacteriana está aún en discusión entre los microbiólogos. Gordon considera que una especie bacteriana es un concepto representado por un grupo de cepas de una variedad de fuentes conteniendo cepas aisladas, mantenidas en el laboratorio por tiempos determinados junto con sus variantes, los cuales tienen en común un patrón de propiedades estables que se correlacionan (Gordon, 1973). Tales propiedades separan los diferentes grupos de cepas. El concepto de especie actualmente reconocido en el género *Bacillus* está principalmente basado en el punto de vista de Gordon y sobre sus estudios prácticos. Sin embargo, el número de posibles experimentos que pueden ser realizados para la caracterización de bacterias es extremadamente grande, y en la práctica, sería imposible ejecutarlos.

Un análisis numérico utilizando los datos provistos por Gordon y col. (1973) claramente mostraron que dentro de muchas especies de *Bacillus* pueden observarse diferentes grupos, con bajos niveles de similitud (Priest, 1988).

**3.2.- ESTUDIOS DE LA PRODUCCION DE
PROTEASA ALCALINA EN
B. licheniformis MIR 29.**

3.2.1.- Preparación del inóculo de la cepa MIR 29.

La cepa conservada en glicerol, fue activada en un medio que contenía caseína o leche al 1,0 % antes de ser utilizada como inóculo en ensayos de medios con fuentes de carbono distintas a la proteica. Se observó que si la cepa se repicaba directamente en el medio a ensayar, no había producción de proteasas.

3.2.2.- Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de proteasa neutra y alcalina.

Los primeros estudios de producción de proteasas por *Bacillus licheniformis* MIR 29 realizados en Erlenmeyers, tendieron a definir algunos parámetros de cultivo tales como composición del medio (medio mínimo sintético o complejo) y temperatura, los cuales nos llevaron a conocer el comportamiento de la cepa en cuanto a su crecimiento y producción de enzimas.

Se ensayaron cultivos a 37, 45 y 52 °C en los medios MM y MS a pH: 7,4. En estos cultivos se determinaron crecimiento celular y las actividades de proteasa alcalina y neutra exocelulares.

A partir de estos resultados (Figuras 3a-c y 4a-c) fueron determinados parámetros de crecimiento de la cepa como velocidad máxima de crecimiento

Figura 3a-c: Crecimiento (a) y producción de proteasa alcalina (b) y neutra (c) en MEDIO MINIMO.

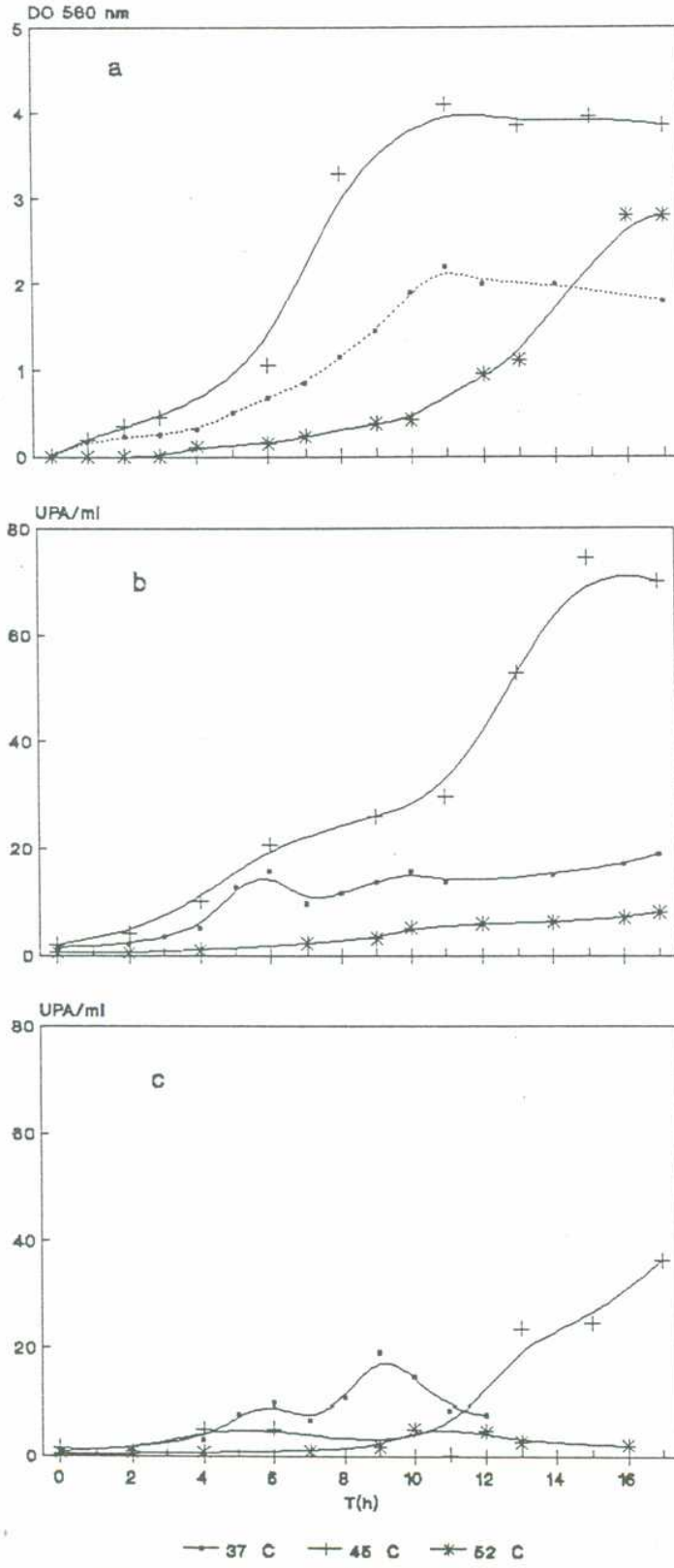
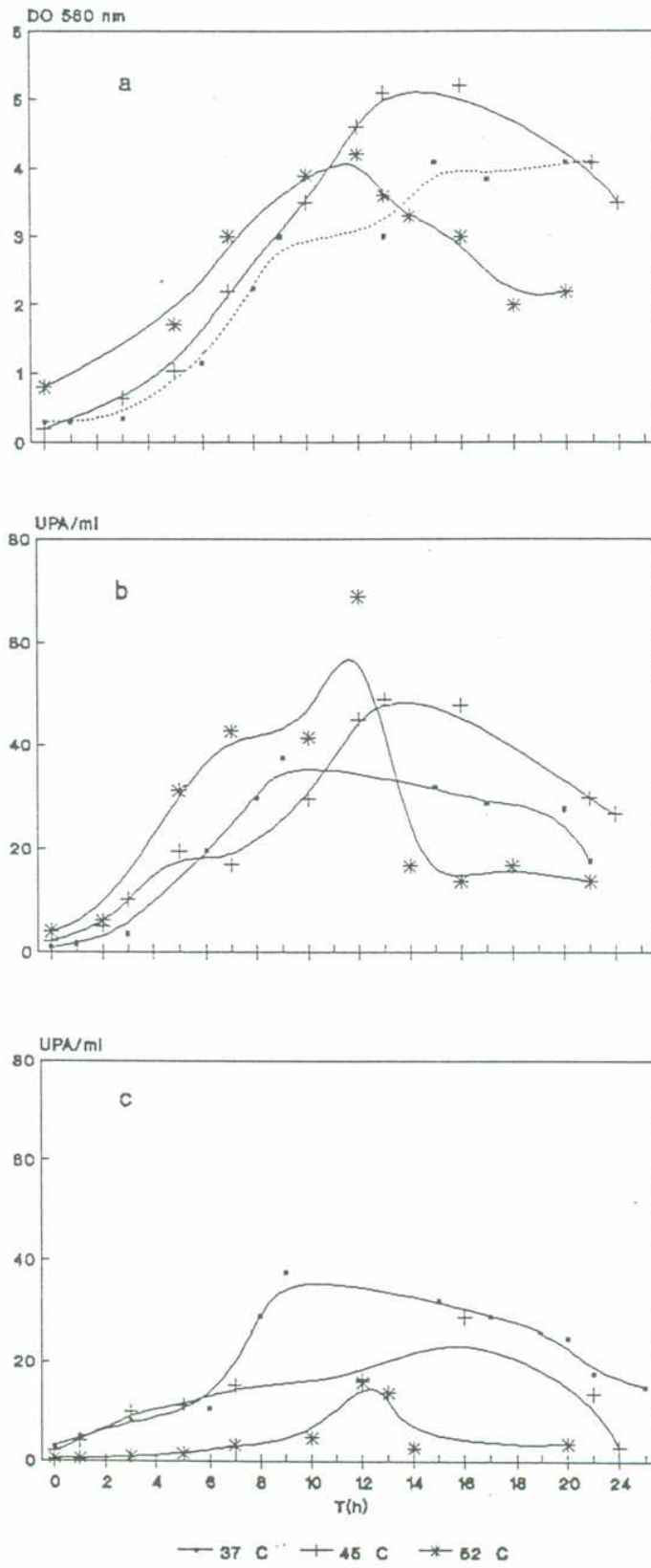


Figura 4a-c: Crecimiento (a) y producción de proteasa alcalina (b) y neutra (c) en MEDIO SUPLEMENTADO



específica, $\mu_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$ (h^{-1}) y tiempo de duplicación del cultivo, t_d (h), según:

$\mu_{\text{m}\ddot{a}\text{x}} = \ln_2/t_d$, en cada una de las condiciones ensayadas (Tabla 1).

La Tabla 2 resume las actividades específicas máximas de proteasas neutra y alcalina, referidas a biomasa, obtenidas en las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento en cultivos por lote.

T (°C)	Medio mínimo		Medio suplement.	
	μ (h^{-1})	t_d (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)
37	0,23	3,0	0,36	1,9
45	0,44	1,6	0,44	1,6
52	0,26	2,7	0,27	2,5

Tabla 2: Actividades máximas de proteasa alcalina y neutra en diferentes condiciones de cultivo por lote.

	37 °C	45 °C	52 °C
Proteasa alcalina			
medio mínimo	15,58	73,30	5,90
medio suplement.	36,52	48,72	69,23
Proteasa neutra			
medio mínimo	18,20	35,72	5,04
medio suplement.	19,38	30,16	15,90

Los resultados observados en las Figuras 3a-c y 4a-c muestran que la producción de proteasa alcalina es máxima a 45 °C (*) en medio mínimo, mientras que la de proteasa neutra lo es a 37 °C (+) en el mismo medio.

Los parámetros de crecimiento de la cepa son constantes si se repiten las condiciones de cultivo, ya que es una característica intrínseca de los microorganismos en esas condiciones de crecimiento. De las Tablas 1 y 2, se observa que la velocidad máxima de crecimiento específica es mayor a 45 °C, tanto en el medio MS como en el MM. A 37 °C μ es mayor en el medio MS que en el medio MM.

Se eligieron las condiciones de cultivo que favorezcan tanto el crecimiento celular como la producción de proteasa alcalina, y que a su vez sea económico y no interfiera en la determinación de la actividad enzimática. Considerando estas características, el cultivo a 45 °C en medio MM, reúne las condiciones deseadas.

3.2.3.- Efecto del pH del cultivo en la producción de proteasa alcalina.

El crecimiento y la producción de proteasa alcalina fueron ensayados en medios MM y MS a pHs 7,5 y 8,5, utilizando caseína 1,0 % como fuente de carbono, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3: Crecimiento y producción de proteasa alcalina a diferentes medios y pHs.

	DO 560 nm	UPA/ml
MM- pH 7,5	6,64	70,63
MM- pH 8,5	1,52	2,74
MS- pH 7,5	4,06	7,29
MS- pH 8,5	2,52	16,08

Los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de proteasa alcalina a pH 7,5 es en medio MM, y a pH 8,5, la producción fue favorecida en un medio MS.

3.2.4.- Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de proteasa alcalina.

Se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento microbiano y la producción de proteasa alcalina, en cultivos en Erlenmeyer. Las determinaciones de crecimiento y actividad enzimática se efectuaron a las 24 hs de cultivo.

La producción de proteasa alcalina fue nula en medios que contenían glucosa, sacarosa, maltosa, xilosa y glicerol. Con otras fuentes de carbono la actividad fue muy baja, mientras que la máxima producción de proteasa alcalina se observa con caseína (Tabla 4).

Tabla 4: Crecimiento microbiano y producción de proteasa alcalina con diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Biomasa (DO 560 nm)	Productiv. volumét. (UPA/ml)
sacarosa	0,95	0,00
D(+)galactosa	2,65	4,16
rafinosa	2,85	5,73
D(+)xilosa	2,55	0,00
almidón	3,14	12,3
D(+)melibiosa	3,20	5,97
lactosa	1,80	6,33
glicerol	1,28	0,00
glucosa	2,15	0,00
inulina	0,72	8,39
maltosa	1,55	0,00
caseína	3,78	76,37

Los ensayos fueron hechos en erlenmeyers con 100 ml de medio, constituido por sales de Zhang suplementadas con la fuente de carbono señalada al 1,0 %.

Las determinaciones de biomasa y actividad de proteasa alcalina fueron realizadas a las 24 hs. de cultivo a 45 °C y pH inicial 7,4

Se fijó un tiempo de 24 hs para cosechar los cultivos para observar, a un tiempo dado, el efecto que una determinada fuente de carbono causa en la producción de proteasa alcalina exocelular y, al mismo tiempo, observar la capacidad de la cepa MIR 29 de metabolizar la fuente carbonada elegida. Sin embargo, se debe tener en cuenta las diferentes velocidades de crecimiento del microorganismo frente a cada fuente de carbono, con la consecuente velocidad de consumo de la misma, y el tiempo en que la síntesis de proteasa alcalina ocurre en cada condición de cultivo impuesta.

De todas maneras el ensayo sirve para indicar aquellas fuentes de carbono que favorecen el crecimiento celular, y simultáneamente permiten una producción considerable de enzima: algunos azúcares como sacarosa, rafinosa, lactosa, galactosa, soportaron un buen crecimiento celular, pero no se detectó actividad de proteasa alcalina, o fue muy baja, al tiempo fijado para cosechar el cultivo. Vale la pena destacar, que si encontramos distintos niveles de producción de proteasa alcalina en estos ensayos, indicaría la presencia de un sistema de síntesis inducible/represible, opuesto a constitutivo, donde en tal caso, hubieramos observado similares actividades específicas en cualquier medio de cultivo. Además, es de esperar, que si observamos represión de la actividad de proteasa alcalina por glucosa, también la observemos en azúcares cuya degradación liberen o se transformen en glucosa para ser metabolizados, como sacarosa y maltosa. Del almidón, cuya degradación produce unidades de glucosa, podría esperarse un efecto

similar, sin embargo hay que considerar cuales enzimas amilolíticas son producidas por la cepa y de qué manera ellas actúan.

3.2.5.- Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de proteasa alcalina.

Diferentes fuentes de nitrógeno fueron ensayadas en cultivos por lote, en condiciones de cultivo idénticas a las utilizadas para estudiar el efecto de las diferentes fuentes de carbono (Tabla 5). Las fuentes orgánicas fueron probadas en una concentración de 0,2 g/l, mientras que las inorgánicas en una concentración de 1,0 g/l, utilizando caseína (5,0 g/l) como fuente de carbono.

Se observa que la actividad de proteasa alcalina exocelular, es baja con urea y con peptona, mientras que con nitrato de sodio es importante, y mayor que la obtenida con sulfato de amonio, fuente nitrogenada utilizada como componente de las sales de Zhang.

Tabla 5: Crecimiento y producción de proteasa alcalina con diferentes fuentes de nitrógeno.

fuelle de nitrógeno	Biomasa (DO 560 nm)	Productividad volumétrica (UPA/ml)
amonio	3,80	73,34
peptona	2,81	15,98
nitrato	3,86	106,50
urea	3,11	2,72

1: Todos los parámetros fueron determinados a las 24 hs. de cultivo.

Si bien el amonio reprime la formación de proteasas (Heineken, 1972), concentraciones limitantes de la sal permiten la producción de la misma (Frankena, 1986). La urea, si bien soportó el crecimiento microbiano tanto como el sulfato de amonio, la concentración utilizada reprimió la síntesis de proteasa exocelular. Estudios posteriores, descritos en esta tesis, demostraron que la urea no tiene efecto sobre la actividad de proteasa alcalina, *in vitro*. El efecto de la peptona no está claro. Algunos trabajos mencionan que la síntesis de proteasa exocelular es fuertemente reprimida por aminoácidos y péptidos en el medio (Doi, 1972), y en este ensayo ese efecto se observaría considerando que la peptona es un hidrolizado de proteínas. Si bien la caseína demostró ser la mejor fuente de carbono y nitrógeno para la síntesis de proteasa alcalina en esta cepa, la degradación gradual de la proteína por el sistema enzimático de las células, permite una liberación también gradual de péptidos y aminoácidos al medio, sustratos que son inmediatamente incorporados a la célula para soportar su crecimiento.

3.2.6.- Producción de proteasa alcalina en fermentadores instrumentados.

Los resultados de los cultivos por lote realizados en Erlenmeyer, permitieron fijar los parámetros fisicoquímicos a utilizar en los cultivos por lote realizados en un fermentador, con control de los distintos parámetros. Las condiciones de cultivo elegidas son las siguientes: pH 7,5; temperatura 45 °C;

% OD (oxígeno disuelto) 20-40 y aireación 0,5-1,0 vvm.

3.2.6.1.- Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y la producción de proteasa alcalina.

La producción de proteasa alcalina en cultivos por lote, fue estudiada con algunas de las fuentes de carbono, ensayadas en Erlenmeyers. Se encontró una relación entre la formación de proteasa alcalina por la cepa y la calidad del sustrato carbonado. En todos los casos, la actividad enzimática fue detectada en la fase exponencial tardía, alcanzando en algunos casos la fase estacionaria del cultivo. Células creciendo en medio mínimo con glucosa no expresaron proteasa alcalina, a menos que el azúcar haya sido consumido en su totalidad.

Se obtuvieron actividades de proteasa alcalina en medios con almidón (12,7 UPA/l), glicerol (17,7 UPA/l) y glucosa (16,2 UPA/l); pero la máxima actividad de proteasa alcalina fue obtenida con caseína (71,0 UPA/l) (Figuras 5a-b). Con estos valores de actividad enzimática, uno puede observar que habría una síntesis basal de proteasa alcalina en medios con almidón, glucosa y glicerol y una síntesis inducida con caseína. Algunos parámetros determinados en estos ensayos están detallados en la **Tabla 6**.

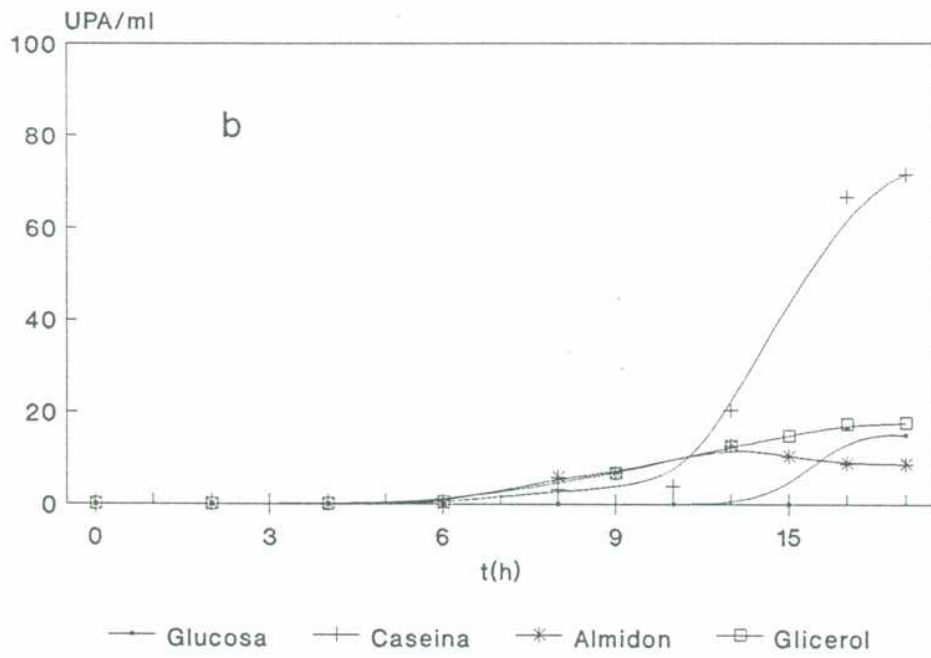
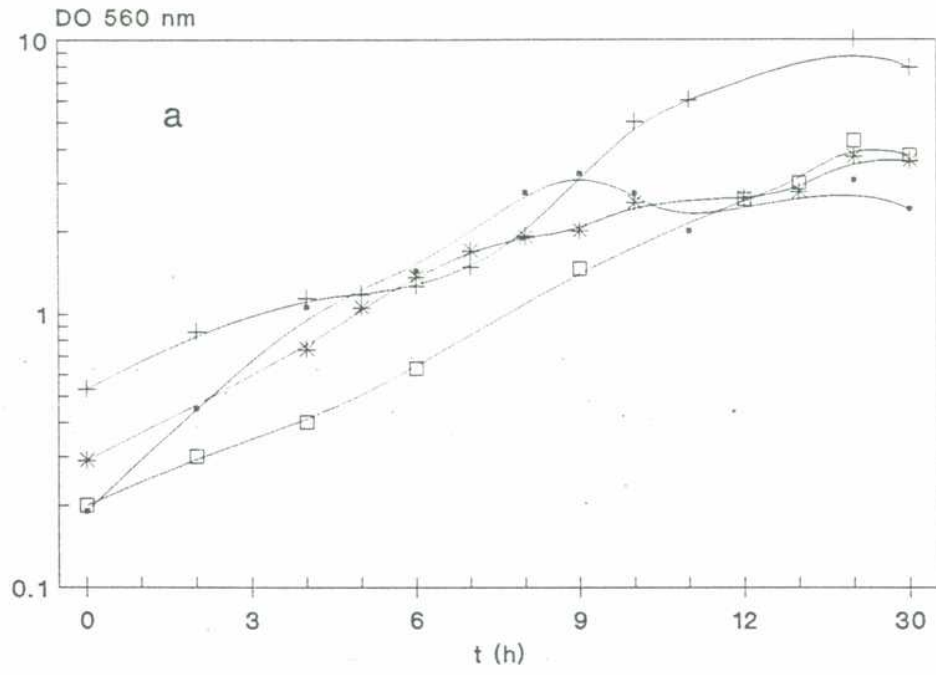
Cultivos realizados en medio basal con caseína 0,4 % suplementado con glucosa 0,1 %, mostraron un comportamiento, en cuanto al crecimiento

celular, de tipo diáuxico y la actividad de proteasa alcalina fue detectada cuando la glucosa fue totalmente consumida y los microorganismos comenzaron a crecer a expensas de la caseína.

La producción de proteasa alcalina en esta segunda fase fue apenas menor que la obtenida en un cultivo iniciado con caseína (**Figura 6**).

Microscópicamente, los cultivos en presencia de glucosa mostraron lisis celular a medida que se acercaba a la finalización de la fase exponencial, no observándose la formación de esporas. Este fenómeno también se reflejó en la densidad óptica del cultivo. La misma comenzó a descender al entrar el cultivo en fase estacionaria, momento en el cual la glucosa había sido totalmente consumida, para recuperarse luego como consecuencia del consumo de los productos de la lisis por parte de las células vivas, las cuales produjeron proteasa alcalina exocelular. Este fenómeno fue observado en sucesivos cultivos con glucosa, concluyendo lo que en los primeros estudios de este tipo había propuesto Schaeffer (1969): que la iniciación de la esporulación y algunos eventos asociados a ella, incluyendo la síntesis de exoenzimas, está regulada por un mecanismo de represión catabólica.

Figura 5a-b: Crecimiento (a) y producción de proteasa alcalina (b) con diferentes fuentes de carbono.



—•— Glucosa -+ Caseina -* Almidon -□ Glicerol

Figura 6: Crecimiento y actividad de proteasa alcalina con fuente de carbono mixta.

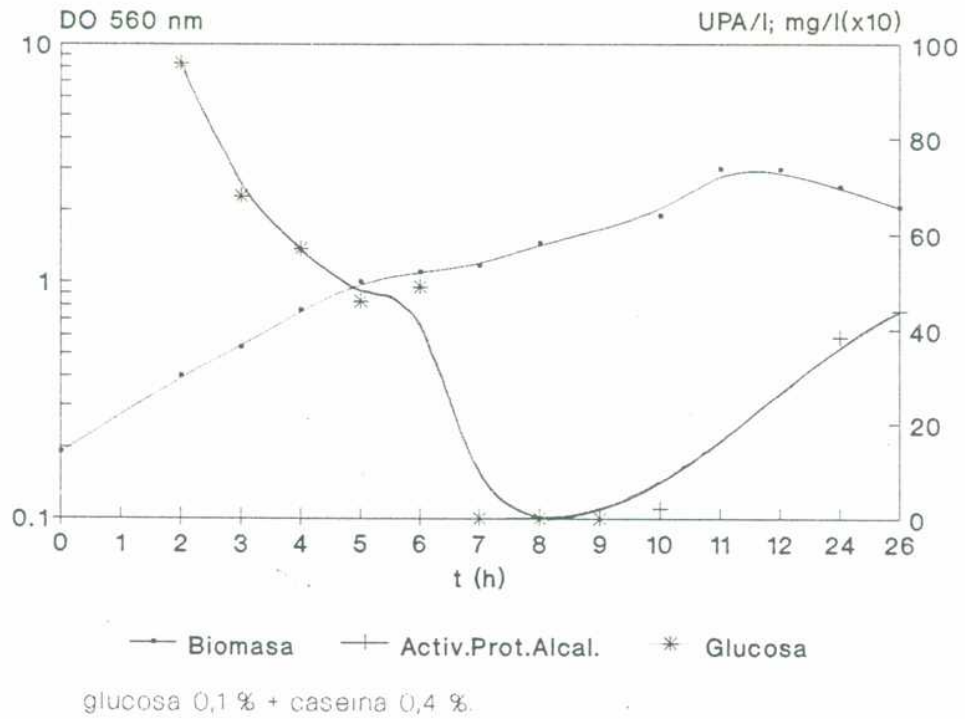


Tabla 6: Producción de proteasa alcalina en cultivo por lotes de *B. licheniformis* MIR 29 con diferentes fuentes de carbono.

	Cas.	Glu.	Alm.	Gli.
veloc.máx. de crec. μ (1/h)	0,33	0,66	0,27	0,30
DO (560 nm) 1	7,9	3,08	2,63	3,80
producc.máx. (U/ml)	71,5	16,5	12,7	17,7
productiv. (U/L.h)	2.383	686,6	1058,3	590,0

1: corresponde a la máxima producción de proteasa alcalina.

Cas.: caseína
 Glu.: glucosa
 Alm.: almidón
 Gly.: glicerol

3.2.6.2.- Efecto del alcalinizante en el crecimiento microbiano y la producción de proteasa alcalina.

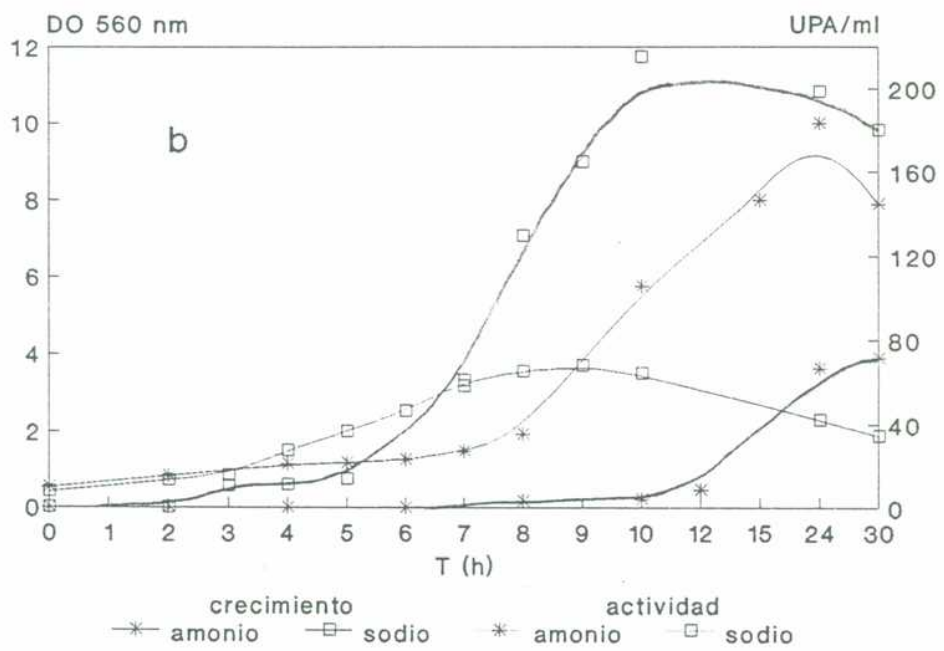
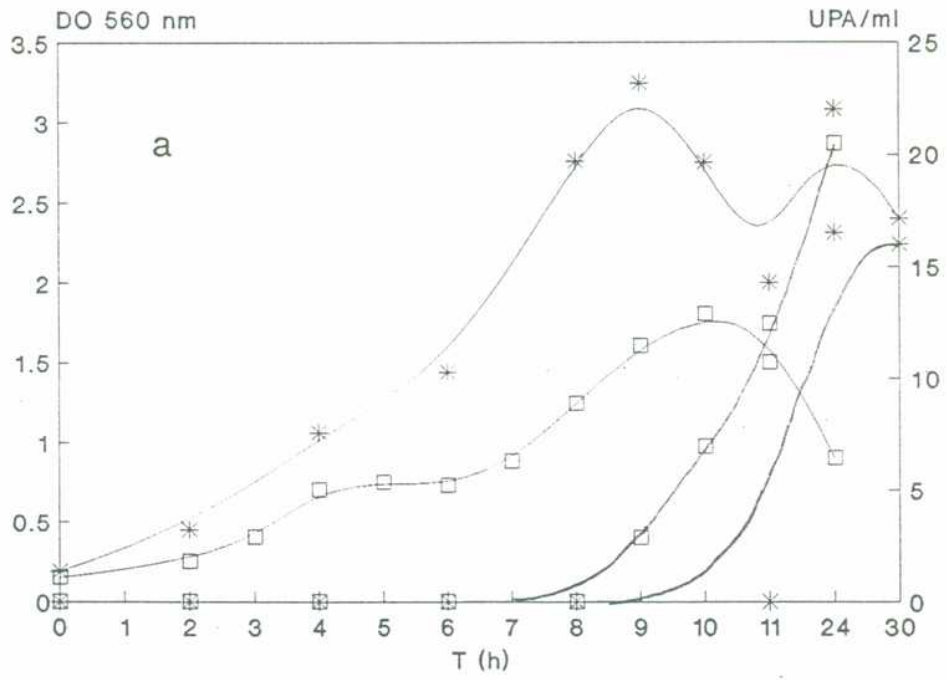
El crecimiento y la producción de proteasa alcalina también fueron estudiados en cultivos utilizando diferentes alcalinizantes, con la sospecha que el NH_3 podía interferir en la producción de proteasa alcalina en el cultivo. Fueron empleadas soluciones de NaOH 3,0 N y de NH_3 1,5 M como soluciones alcalinizantes. Se realizaron curvas de crecimiento empleando caseína (0,5 %) o glucosa (0,25 %) como fuentes de carbono, utilizando ambas bases alternativamente.

Los resultados son concluyentes. El cultivo con caseína mostró una actividad exocelular máxima de proteasa alcalina 3 veces mayor, cuando se utilizó NaOH comparada con la obtenida usando NH_3 , observando una reducción de casi el 50 % en la densidad óptica máxima alcanzada por el cultivo regulado con NH_3 (Figuras 7a-b).

Cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, no hubo un aumento significativo de la actividad máxima de proteasa alcalina entre ambas bases, siendo de 1,2 veces la actividad máxima alcanzada con NaOH , aunque en este caso se observó un incremento de aproximadamente el 50 % en la densidad óptica máxima alcanzada por el cultivo referido al uso de NH_3 .

El efecto del amonio como represor de la síntesis de proteasa alcalina, se observa aquí al utilizarlo como alcalinizante en cultivos por lote con pH

Figura 7a-b: Crecimiento y actividad de proteasa alcalina en glucosa (a) y caseína (b) con diferentes alcalinizantes.



crecimiento actividad
 * amonio □ sodio * amonio □ sodio

controlado. La base es consumida principalmente durante la fase exponencial del cultivo, debido a la rápida y constante acidificación del medio como consecuencia del metabolismo de los microorganismos. Utilizando NH_3 como base, la actividad proteolítica aparece exclusivamente en la fase estacionaria. En cambio con NaOH puede detectarse actividad enzimática previamente a esta fase, aunque se alcancen los máximos valores en la fase estacionaria.

En el cultivo con glucosa, prevalece la represión por el monosacárido, más que la posible represión por amonio en la formación de proteasa alcalina.

En un cultivo con caseína a pH libre, la iniciación de la producción de proteasa alcalina exocelular coincide con la acidificación del medio y claramente se observa que los valores de actividad se alcanzan en la fase estacionaria de crecimiento (**Figura 8**).

3.2.6.3.- Estudio del efecto de la fuente de carbono en la inducción de la síntesis de proteasa alcalina en cultivo por lotes.

Los resultados están graficados en las **Figura 9a-b**, donde se observa que con almidón y glucosa el crecimiento microbiano se detiene a las dos horas de comenzar la fase estacionaria, mientras que con caseína y amonio continúa un poco, aunque la diferencia no es muy relevante. Esta detención del crecimiento podría deberse a una limitación de nitrógeno en los medios con almidón y glucosa, que no se da en los medios con caseína y amonio, que

Figura 8: Crecimiento y producción de proteasa alcalina en cultivo por lotes a pH libre.

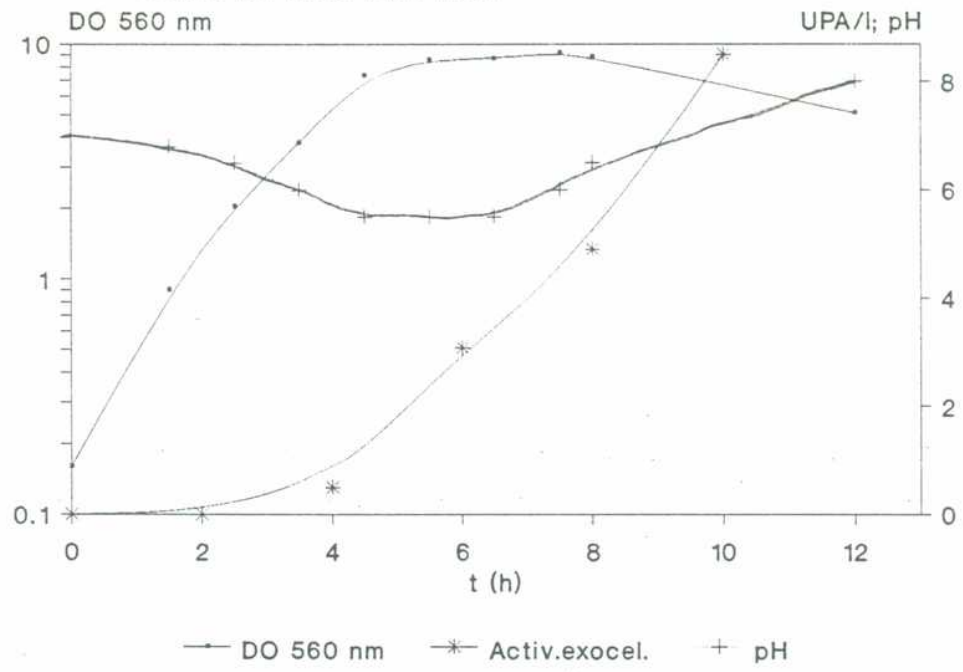
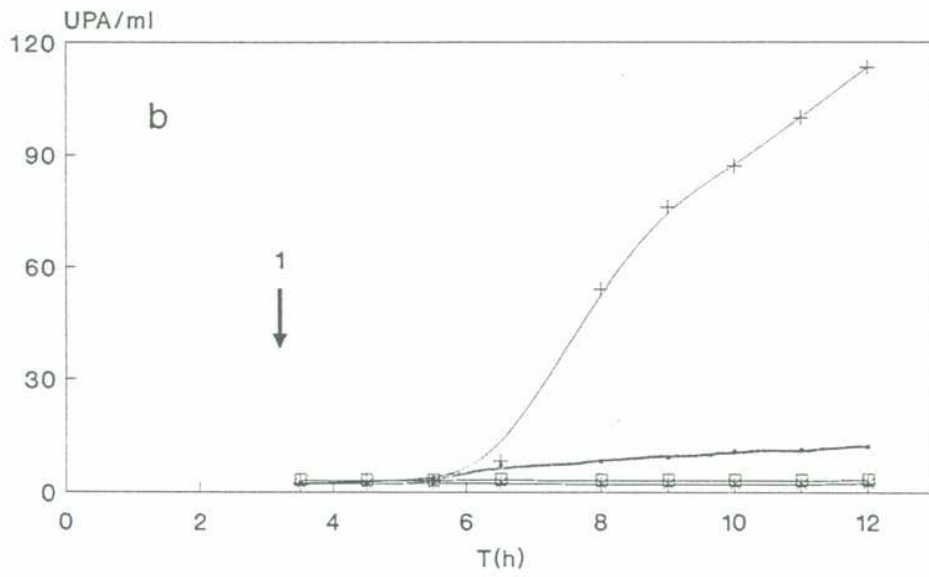
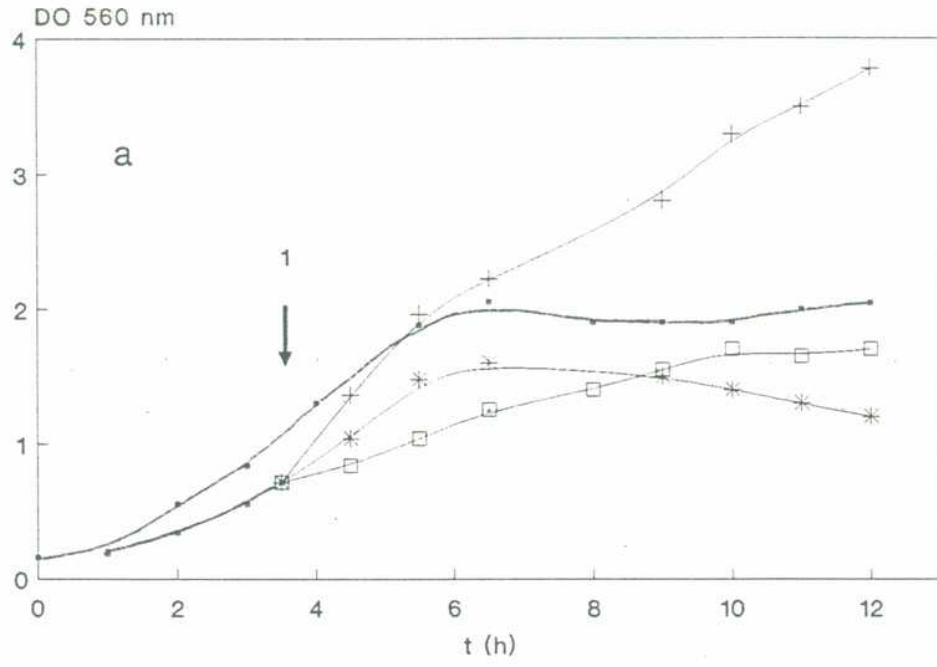


Figura 9a-b: Crecimiento (a) y producción de proteasa alcalina (b) con diferentes pulsos en cultivo por lotes en almidón (control).



• Control + Caseina * Glucosa □ Amonio

1: Transferencia de cultivo a los medios indicados.

poseen estas fuentes de nitrógeno disponibles para las células.

En cuanto a la actividad de proteasa alcalina, observamos que con glucosa y amonio está totalmente reprimida. Aunque en cultivos iniciados en estos medios, la actividad aparece en la fase estacionaria (**Figuras 5a-b**), tal vez no se llegaron a muestrear a los tiempos en que la actividad de proteasa alcalina comienza a manifestarse o, la concentración de glucosa en cultivos con glucosa, es suficientemente baja como para no reprimir totalmente la síntesis, de manera que algo de síntesis es inducida.

En el pulso con caseína, la producción de proteasa alcalina fue mayor que la encontrada en un cultivo iniciado en caseína. Una explicación podría ser que la inducción de la síntesis de proteasa alcalina ocurre por las moléculas enteras de caseína o polipéptidos grandes. Al hacer un pulso de caseína, en el momento inmediatamente anterior al tiempo de inducción de la síntesis enzimática, la inducción es mucho mayor.

De acuerdo a estos resultados, se pensaría en la existencia de una sola enzima con distintos niveles de inducción. La posibilidad de contar con la presencia de dos enzimas con actividad de proteasa alcalina, estaría sujeta a estudios más profundos.

3.2.6.4.- Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con caseína.

El crecimiento y la producción de proteasa alcalina en cultivo continuo

fue observada a distintas velocidades de dilución en medio sintético Zhang con caseína al 0,5 % como fuente de carbono; determinando a diferentes D el crecimiento microbiano, actividades total y exocelular de proteasa alcalina.

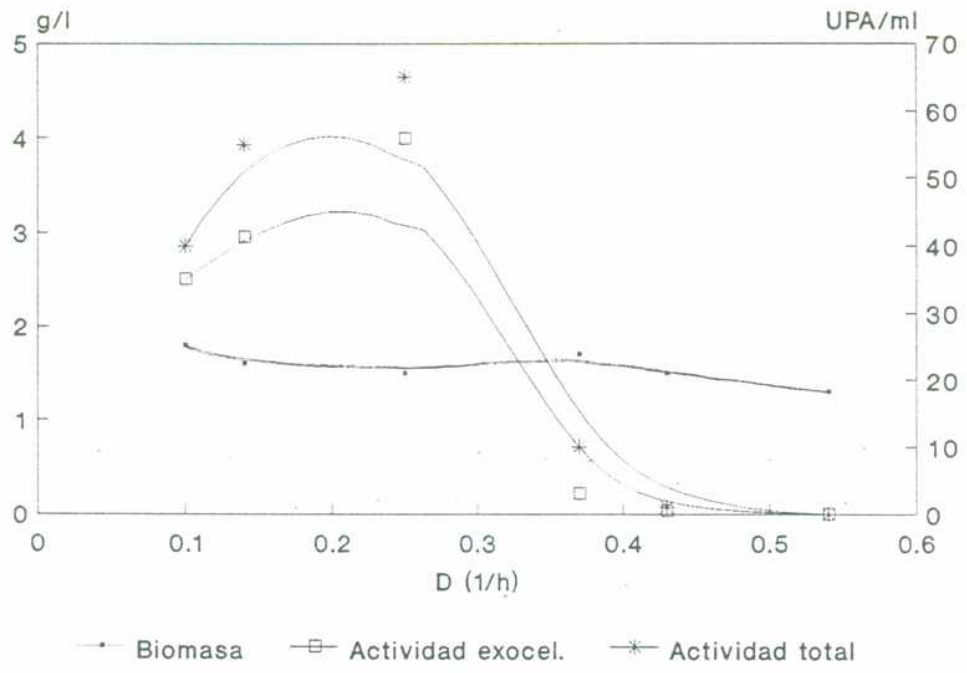
Experimentos previos en cultivo continuo con caseína, mostraron que la actividad proteolítica también se vio influenciada por la velocidad de crecimiento específica del microorganismo, asociada ésta a la D fijada para el cultivo. Se observa una actividad exocelular máxima de 55,84 APU/ml a una $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ (correspondiente al 90 % de la actividad total). Los perfiles de producción de proteasa alcalina en cultivo continuo con caseína se ven en la **Figura 10**.

Se determinó en este ensayo una $\mu_m = 0,65 \text{ h}^{-1}$, mientras que el máximo de actividad proteolítica se obtiene a una D que corresponde al 40,3 % de la μ_m , determinada por lavado. Este comportamiento será discutido más adelante, cuando se compare con los resultados del cultivo continuo con glucosa.

3.2.6.5.- Comportamiento de la cepa MIR 29 en cultivo continuo con glucosa.

Los resultados del cultivo continuo con glucosa muestran una producción de proteasa alcalina exocelular máxima de 19,26 APU/ml a muy baja D ($0,04 \text{ h}^{-1}$), correspondiendo sólo al 5,2 % de la μ_m del cultivo, que es de $0,77 \text{ h}^{-1}$. La actividad total máxima se encuentra a la misma D que la

Figura 10: Producción de proteasa alcalina exocelular en cultivo continuo con caseína 5,0 g/l.



máxima exocelular, y ésta corresponde al 71,7 % de la actividad total. Sin embargo, a una $D = 0,52 \text{ h}^{-1}$, donde la actividad exocelular es muy baja, existe una actividad total que es 10 veces mayor (Figuras 11a-b), de manera tal que se exporta solo el 10 % de la enzima sintetizada. Esta notable diferencia entre la actividad total y la exocelular, significa que parte de la actividad de proteasa alcalina queda unida a la célula, sin exportarse.

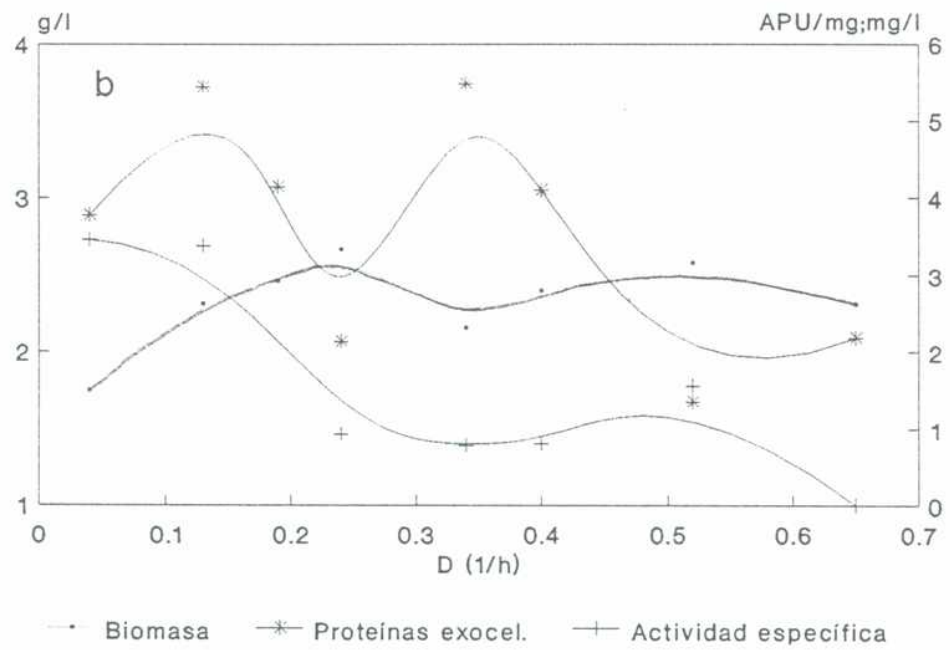
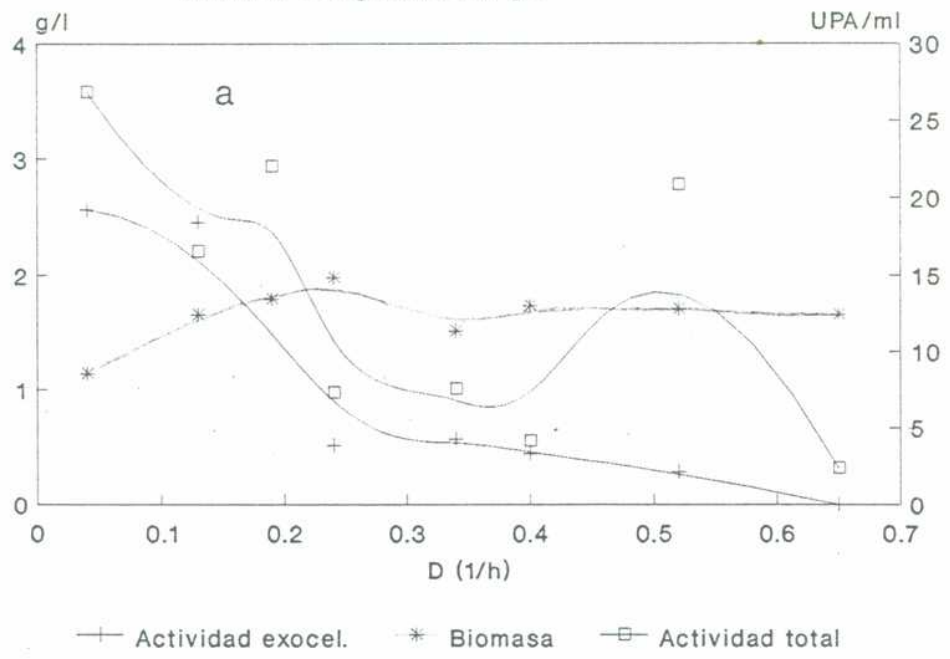
No se descarta la posibilidad que la glucosa posea algún efecto sobre la exportación de la enzima además de su síntesis. Otra explicación sería que esta actividad podría deberse a la existencia de otra actividad de proteasa alcalina.

Durante el crecimiento con limitación de carbono en quimiostato, se genera, con el incremento de la D , un progresivo incremento en la concentración de la fuente de carbono en el estado estacionario en el que transcurre el crecimiento.

Así, para la síntesis de enzimas cuya actividad aumenta con el decrecimiento en los valores de D , la explicación más simple es la liberación de la represión catabólica (Matin, 1981).

De esta manera se explica el perfil de actividad de proteasa alcalina en cultivo continuo a distintos valores de D , en medio con glucosa. En cultivos por lote con glucosa, ya habíamos observado que la producción de proteasa alcalina es reprimida por el azúcar. En cultivo continuo, en condiciones de limitación por carbono, a medida que se incrementan los valores de D ,

Figura 11a-b: Producción de proteasa alcalina en cultivo continuo con glucosa 2,5 g/l.



La actividad específica está referida a proteínas.

aumenta también la concentración de glucosa residual, reprimiendo progresivamente la síntesis de proteasa alcalina exocelular.

Smith (1972) demostró en estudios de producción de β -galactosidasa en *Klebsiella aerogenes*, que el decrecimiento en la actividad de una enzima inducible a bajos valores de D, es el resultado del decrecimiento de la concentración del inductor. Un perfil similar de actividad se observa para la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* MIR 29 en un cultivo con caseína. El cultivo muestra una actividad exocelular máxima a D intermedias y un decrecimiento en la actividad enzimática por debajo del punto de inflexión, debido al decaimiento en la concentración de caseína.

Así, mientras la D se incrementa, la concentración efectiva del inductor aumenta, pero también aumenta la concentración de moléculas represoras, volviéndose éstas dominantes (Matin, 1981). Los resultados comparativos de los cultivos en continuo con glucosa y caseína se muestran en la **Figura 12** y en la **Tabla 7** se resumen algunos parámetros determinados en cultivo continuo con ambos sustratos limitantes.

3.2.6.6.- Ensayo de pulsos de glucosa y caseína en cultivo continuo.

En este ensayo se quiso conocer en qué medida se producía la inhibición de la síntesis de proteasa alcalina por glucosa, resultado que había sido previamente obtenido en cultivo continuo con glucosa y en el cambio de

Figura 12. Perfiles de producción de proteasa alcalina exocelular en cultivo continuo.

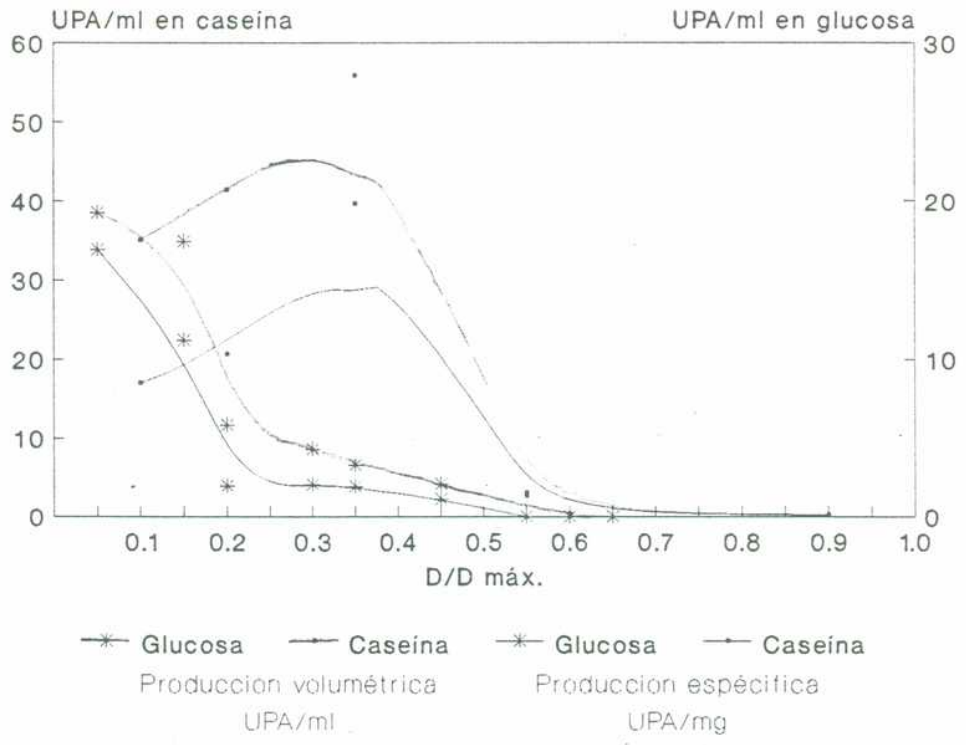


Tabla 7: Producción de proteasa alcalina en cultivo continuo de *B. licheniformis* MIR 29 con glucosa y caseína.

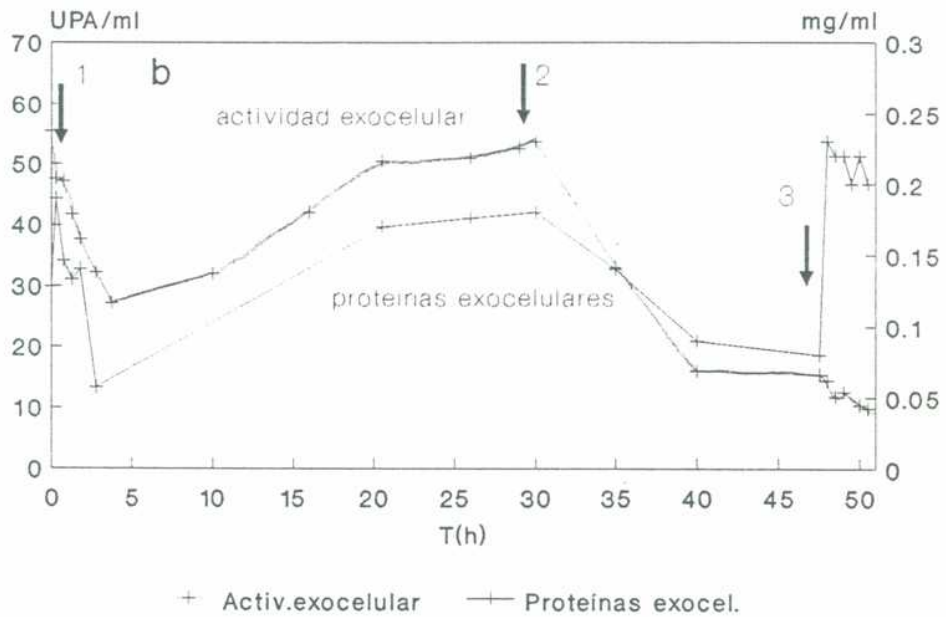
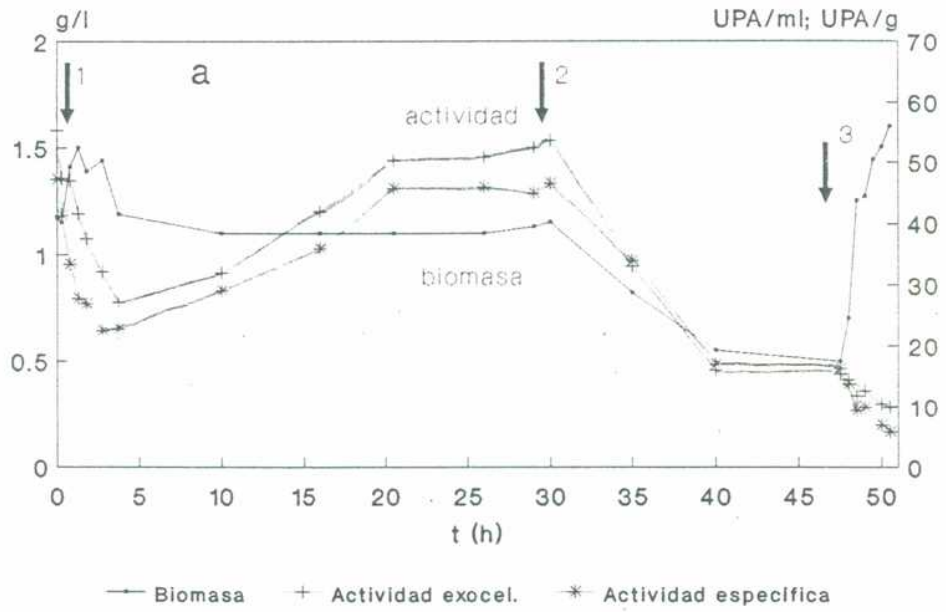
	Glucosa	Caseína
veloc. máx. de crecimiento μ (1/h)	0,772	0,654
producción de biomasa (g/l)	1,76	1,41
productividad de biomasa (g/l.h)	44,0	5,64
<u>actividad exocelular de PA.</u>		
D de máx. producción (1/h)	0,04	0,25
concentración de la enzima (U/ml)	19,26	55,8
producción específica (U/g) 1	10,94	39,60
productividad (U/l.h)	481,90	223,36
% de μ máx.	5,4	40,3
<u>actividad total de PA.</u>		
D de máx. producción (1/h)	0,04	0,25
concentración de la enzima (U/ml)	26,86	62,04
producción específica (U/g) 1	15,26	44,00
productividad (U/l.h)	671,50	248,16
relación activ.exocelular/ activ.total	0,727	0,90

1: referida a biomasa.

PA: proteasa alcalina.

D: velocidad de dilución del cultivo.

Figura 13a-b: Ensayo de pulsos con glucosa y caseína en cultivo continuo. $D=0,12$ 1/h.



1: pulso glu 2,0g/l; 2: shift glu 2,5 g/l; 3: pulso cas 5g/l

fuerza de carbono en cultivo por lote; y ademas, confirmar el papel "inductor" de la caseína. Analizando las Figuras 13a-b, observamos que despues del primer pulso de glucosa (2,0 g/l) en un cultivo continuo con caseína, la actividad de proteasa alcalina exocelular decae durante las primeras 5 horas despues del pulso, recuperando nuevamente la actividad encontrada en cultivo continuo con caseína.

El cambio a 2,5 g/l trajo aparejado nuevamente una cada en la síntesis de proteasa alcalina, sin embargo con el pulso de 5,0 g/l de caseína, la actividad enzimática no se recupera. La glucosa produce una inhibición continua de la síntesis de enzimas en presencia de inductores adecuados, como la caseína o productos de su degradación.

Sabemos ademas, que la glucosa previene la entrada de sustratos inductores por inactivación de sus permeasas.

La cada en la concentración de proteínas exocelulares se correlaciona con el pulso y la alimentación de glucosa, sugiriendo que la glucosa podría tener un efecto negativo en la exportación de proteínas al medio de cultivo, conclusión que no había sido descartada despues de observar los resultados del cultivo continuo con glucosa (**Figura 11**).

El rol de la glucosa en la regulación de la síntesis y liberación de proteasa alcalina, en cultivo continuo con limitación de carbono y 1,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se evidencia por la cada de los valores de proteínas exocelulares y de actividad total.

Es sabido que la glucosa tiene efecto en la represión de operones que tienen que ver con la síntesis de enzimas degradativas, y las proteasas exocelulares no escapan a dicho fenómeno (Priest, 1977; Matin, 1981; Heineken, 1972; Basalp, 1992). Nuevamente, es difícil disociar el fenómeno de esporulación del de la síntesis de proteasas, más aún cuando existen efectores o represores comunes como es el caso de la glucosa (Basalp, 1992; López, 1980).

3.2.6.7.- Efecto de la fuente nitrogenada incluida en el medio de producción en cultivo continuo.

Se realizaron ensayos en cultivo continuo a un $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$, utilizando medio mínimo con glicerol 0,5 % como fuente de carbono y variando la calidad y la concentración de la fuente de carbono. Una vez alcanzado el estado estacionario con un determinado medio, se tomaron al menos 3 muestras en ese estado y posteriormente se realizó un cambio de medio (shift), siguiendo los pasos anteriores para cada ensayo. De cada muestra fueron determinados los siguientes parámetros: proteínas exocelulares, actividades exocelular y total de proteasa alcalina, biomasa, glicerol y amonio remanente. Los medios utilizados son los que se describen a continuación:

Medio 1. Glicerol 0,5 %; Na NO_3 7,8 mM.

Medio 2. Glicerol 0,5 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7,8 mM.

Medio 3. Glicerol 0,5 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40,0 mM.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos con los diferentes medios.

Tabla 8: Efecto de la fuente de nitrógeno en cultivo continuo.

MEDIO	1	2	3
Actividad exocel. (UPA/ml)	22,5	33,1	0,0
Actividad total (UPA/ml)	27,6	33,2	0,0
% de exportación	81,5	99,7	0,0
Biomasa (g/l)	1,13	1,62	1,58
Actividad especí. (UPA/g)	19,9	20,4	0,0
Proteínas exocel. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	28,2	110,2	18,7
Actividad especí. (UPA/mgP)	797,8	300,9	0,0

El medio 1 representaría un medio control, donde la producción de proteasa alcalina no se ve influenciada por el amonio, y la síntesis se produce normalmente con limitación de la fuente de carbono. El medio 2 contiene concentraciones limitantes de amonio, que por otro lado se mantuvieron cercanas a cero durante todo el cultivo continuo. En este medio hubo producción de proteasa alcalina exocelular y total, de manera tal que el amonio en concentraciones limitantes no reprimió la síntesis de proteasa alcalina. El medio 3 posee la fuente de carbono limitante y se mide una concentración considerable de amonio excedente en el cultivo. Se determinó la presencia de 16,3 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que el microorganismo no llega a consumir de los 29,7 mM de sal de amonio que contenía el medio de cultivo. Evidentemente hubo un exceso de amonio que afectó la producción de proteasa alcalina total y

exocelular, y que no incidió en la exportación sino directamente sobre la síntesis de la enzima.

3.2.7.- Ensayo de inducción de la caseína sobre la síntesis de proteasa alcalina.

En todo momento se habló de que la síntesis de proteasa alcalina se veía favorecida en pre-cultivos y cultivos con caseína, haciendo pulsos de la misma en otros medios de crecimiento. De allí que siempre estuvo latente la idea del papel inductor de la caseína sobre la síntesis de proteasa alcalina.

Para demostrarlo, se hicieron dos cultivos en erlenmeyers con 100 ml de medio MM con 0,5 % de almidón e incubados a 45 °C con agitación. El crecimiento celular fue monitoreado por turbidimetría, trazando las curvas de crecimiento correspondientes. A una densidad óptica de aproximadamente 1,0, en fase exponencial, 50 ml de uno de los cultivos fueron transferidos a dos frascos conteniendo 0,5 ml de una solución de caseína al 10 % cada uno, para tener una concentración final de la misma de 0,2 %, . Estos frascos volvieron a incubarse. El otro erlenmeyer de 100 ml fue tomado como control de crecimiento y producción de proteasa alcalina en almidón. A los 150 minutos de incubación de los frascos con caseína, a uno de ellos se le agregó 25 μ l de streptomina en solución acuosa de 5 mg/ml (Cutting y col., 1990), para dar una concentración final del antibiótico de 10 μ g/ml y se continuó con

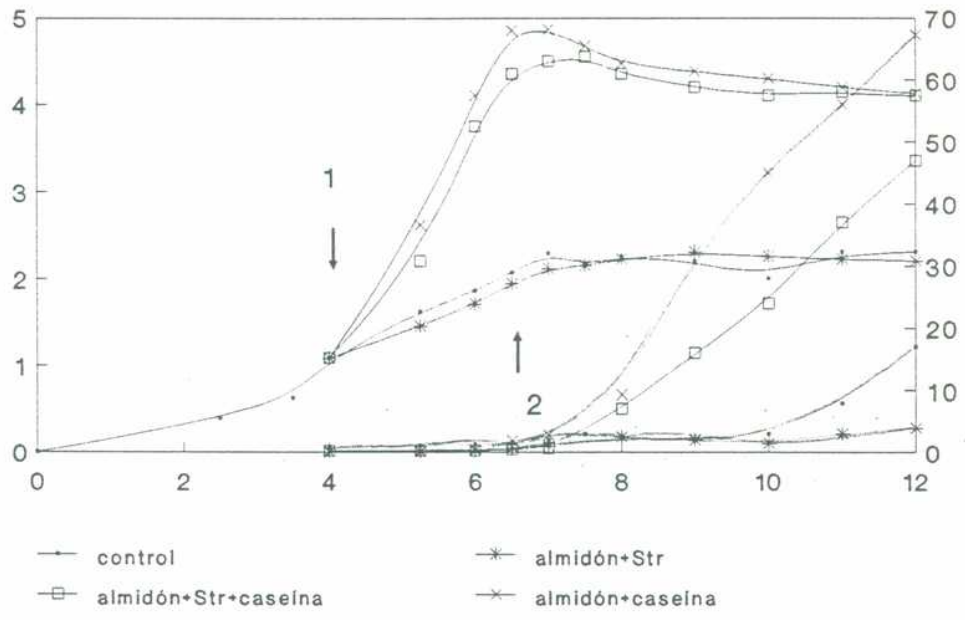
la incubación. Al mismo tiempo se transfirieron 25 ml del cultivo original a un frasco al cual se le agregó también streptomycin, y se siguió la incubación.

Así, quedaron definidos los siguientes medios:

- 1- almidón: control de crecimiento y producción.
- 2- almidón + streptomycin: control del efecto del antibiótico.
- 3- almidón + streptomycin + caseína: efecto de la caseína sobre la síntesis proteica.
- 4- almidón + caseína: efecto de la caseína en el crecimiento y la producción de proteasa alcalina.

Los resultados se observan en la **Figura 14**. El efecto favorable de la caseína sobre el crecimiento microbiano se observó inmediatamente después de realizado el pulso de la misma. La streptomycin adicionada al cultivo en un tiempo próximo a la fase estacionaria, no produjo el efecto de detención del crecimiento celular. La streptomycin es un inhibidor de la síntesis de proteínas, porque se une irreversiblemente a los ribosomas, deteniendo el crecimiento y al mismo tiempo produciendo la muerte celular, pero no hay lisis, por lo que la turbidez del cultivo se mantiene constante por un tiempo (Brock, 1978). Pero este efecto se observa en cultivos en donde el antibiótico fue adicionado en la fase exponencial de crecimiento, no así en la fase estacionaria, donde las células comienzan a morir o a esporular, y por lo tanto, su metabolismo y toda su maquinaria de síntesis se detiene o se retarda.

Figura 14: Inducción de la síntesis de proteasa alcalina con caseína, en presencia de streptomicina.



1: caseína 0,2 %; 2: streptomicina 10 µg/ml.

El efecto de la caseína ya había sido observado anteriormente, donde veíamos que la síntesis de proteasa alcalina se favorecía en presencia del sustrato proteico. En el medio control, la síntesis de proteasa alcalina fue basal. Con caseína, la actividad de proteasa alcalina detectada fue menor en presencia del antibiótico, que aquella obtenida sin él.

Con este ensayo, se verifica el papel inductor de la caseína sobre la síntesis *de novo* de proteasa alcalina, no tratándose de una modificación post-transcripcional o activación de la enzima. El efecto "potenciador" de la caseína, si bien se observa mucho tiempo después de realizado el pulso, se produce aún con el agregado de antibiótico. Es en el tiempo que transcurrió entre el pulso de caseína y el de streptomina, que pudo haber transcripción del gen de la proteasa alcalina y sintetizarse algo de enzima. La caseína aumenta considerablemente la actividad de proteasa alcalina detectada, adelantando su aparición en el medio de cultivo y elevando también su actividad específica, puesto que la cantidad de proteínas finales sintetizadas fue mucho mayor, respecto del control: 304 $\mu\text{g/ml}$, con caseína; 161,8 $\mu\text{g/ml}$, con caseína más antibiótico y, 30,1 $\mu\text{g/ml}$ y 26,6 $\mu\text{g/ml}$, con almidón y almidón más streptomina, respectivamente.

**3.3.- ESTUDIOS ENZIMATICOS DE LA
PROTEASA ALCALINA PARCIALMENTE
PURIFICADA.**

Se realizaron ensayos tendientes a conocer algunas características fisicoquímicas de la actividad de proteasa alcalina producida por *Bacillus licheniformis* MIR 29, tales como: pH y temperatura óptima de la actividad proteolítica, estabilidad térmica y el efecto de compuestos químicos, inhibidores potenciales de la actividad proteolítica.

3.3.1.- Resultados de la purificación parcial de proteasa alcalina con acetona, sulfato de amonio y CENTRICOM.

Los resultados de la purificación parcial con acetona fueron sorprendentes, ya que no solo se obtuvieron bajos rendimientos en los precipitados con 30, 40 y 50 % de acetona, sino que las mayores actividades de proteasa alcalina fueron encontradas en la fracción soluble en el solvente, obteniéndose en ellas rendimientos del 62,2 %, 58,1 % y 55,2 %, respectivamente. Por otro lado, la actividad se mantuvo en acetona por 12 hs a 4°C, por lo que la enzima no se vería afectada en su conformación, manteniendo su actividad proteolítica. De los datos de la tabla de purificación por precipitación salina con sulfato de amonio, se observa que se obtuvo un rendimiento del 28 % en la precipitación parcial con 70 % de sulfato de amonio, permitiendo tener 5 veces más actividad respecto del extracto crudo.

Tabla 9: Purificación parcial con acetona.

	Vol. (ml)	Proteínas $\mu\text{g/ml}$	Act.prot. UPA/ml	AE UPA/ μg	Purif. (1)	Act.tot. UPA	Rend. % (2)
E.c.	5	74,5	6,5	0,087	1,0	32,5	100
S ₃₀	1	22,5	20,34	0,90	10,3	20,34	62,6
S ₄₀	1	22,5	18,89	0,84	9,6	18,89	58,1
S ₅₀	1	22,5	17,93	0,80	9,2	17,93	55,2
P ₃₀	1	17,8	5,1	0,29	3,3	5,1	15,7
P ₄₀	1	28,7	4,6	0,16	1,8	4,6	14,1
P ₅₀	1	34,0	3,2	0,094	1,1	3,2	9,8

(1) Grado de purificación: AE (purif.)/AE (ext.crudo).

(2) Rendimiento: UPA tot. (purif.)/ UPA tot. (ext. crudo).

Tabla 10: Purificación con sulfato de amonio.

	Vol. ml	Prot. $\mu\text{/ml}$	Actividad UPA/ml	Act.espec. UPA/ $\mu\text{g P.}$	Pur.	UPA.tot.	R.
EC.	40	21,17	5,13	0,24	1,0	205,2	100
50	2,5	1,04	8,75	8,4	35,0	21,8	10,6
70	2,5	5,4	23,0	4,26	17,7	57,5	28,0

Abreviaturas: EC, extracto crudo; 50 y 70, 50 % y 70 % de sulfato de amonio, respectivamente; Prot. y P., proteínas; UPA, unidades de proteasa alcalina; Act.espec., actividad específica; Pur., grado de purificación; UPA.tot., unidades proteolíticas totales; R., rendimiento.

El uso de membranas de ultrafiltración (CENTRICOM 10) como sistema de concentración, permitió eliminar moléculas de $PM < 10$ KD. Esto resultó en un incremento de la actividad proteolítica total y, mientras la concentración de proteínas se mantuvo constante antes y después del ensayo, la actividad de proteasa alcalina se incrementó entre 30 y 100 %. Se obtuvieron rendimientos de purificación entre un 60 y un 85 %, lo que dependió del medio de cultivo del cual provino el extracto enzimático y del número de ultracentrifugaciones realizadas.

Hay que destacar que los intentos de purificación de la actividad de proteasa alcalina fueron hechos para poder caracterizarla parcialmente, determinando algunos parámetros fisicoquímicos deseables para la industria en la cual se la utiliza. En todo momento nos referimos a la actividad de proteasa alcalina y no a la/s enzima/s aislada/s, puesto que no sabíamos, hasta el momento, si esa actividad proteolítica encontrada se debía a la presencia de una o más enzimas, responsables de la actividad de proteasa alcalina.

3.3.2.- Determinación del pH y temperatura óptimos de la actividad proteolítica.

La relación entre el pH de reacción y la actividad de proteasa alcalina, revelan una afinidad de la enzima por soluciones alcalinas (**Figura 15**).

Si bien reportes del pH óptimo de actividad de estas enzimas

bacterianas está en el rango 8-11, particularmente las enzimas industriales toleran bien pHs mayores, como es el caso de las proteasas utilizadas como componentes de detergentes, las cuales pueden actuar a pH 11-12 (Kalisz, 1988). La actividad de proteasa alcalina de la cepa MIR 29 tiene un pH óptimo entre 12-13 a 37 °C. Esto es muy conveniente desde el punto de vista industrial. El pH de los detergentes utilizados en lavaderos industriales es generalmente 9,0-10,5 (Kalisz, 1988).

El pH óptimo de actividad de proteasa alcalina no coincide con el pH de producción (7,0-7,5), situación que se repite en la producción de numerosas enzimas exocelulares de *Bacillus*. Proteasas alcalinas aisladas de *Bacillus* alcalófilos, tienen un pH óptimo de actividad entre 9 y 12, y si bien la cepa fue aislada a pH 10,0 los cultivos para la producción de enzimas fueron ajustados a pH 7,0-9,0 (Tsai, 1988; Durham, 1987; Takami, 1989).

En cuanto a la temperatura óptima de la actividad proteolítica (**Figura 16**), se graficaron las velocidades iniciales, que corresponden a la velocidad máxima de actividad enzimática a esa temperatura. Se observa que a 60 °C se obtiene la máxima velocidad inicial, decayendo considerablemente a 70 °C.

Numerosas proteasas alcalinas producidas por cepas de *Bacillus* tienen temperaturas óptimas de actividad elevadas (Takami, 1989; Keay, 1987; Razak, 1994).

Figura 15: Influencia del pH en la actividad de proteasa alcalina.

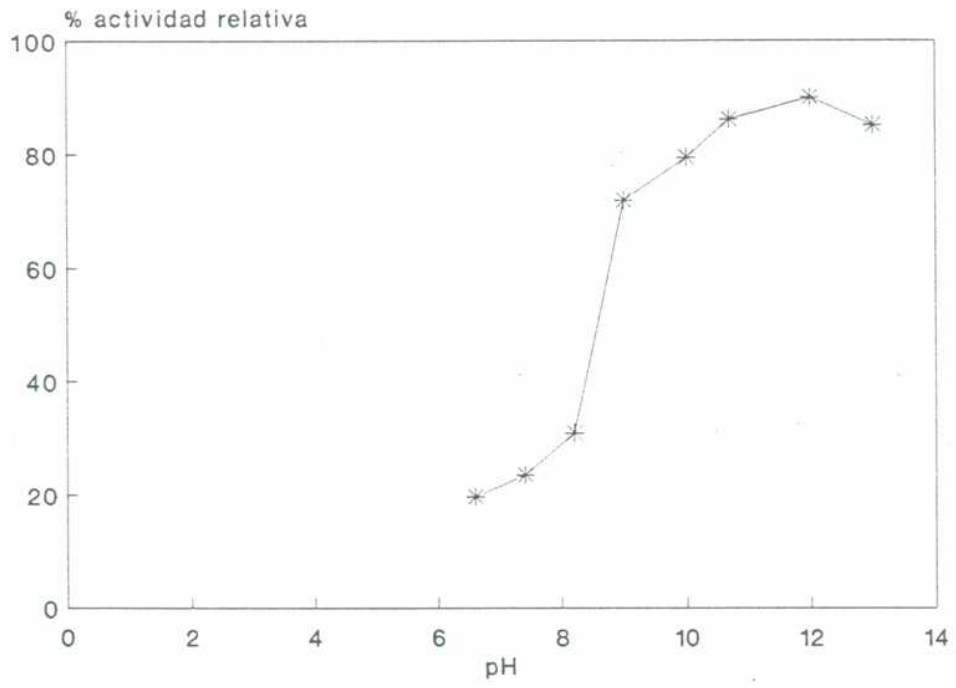
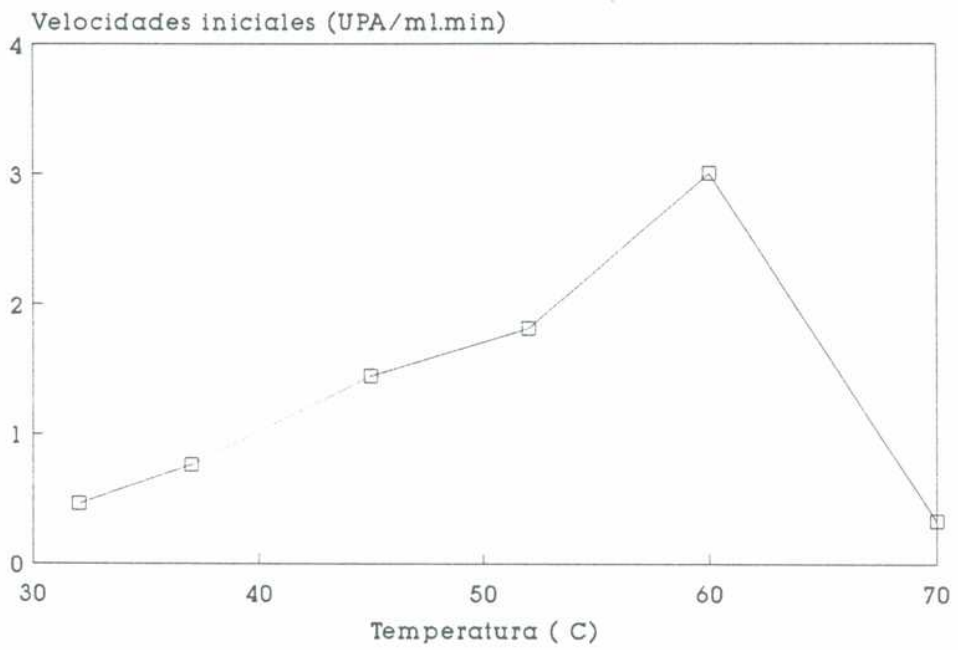


Figura 16: Efecto de la temperatura en la actividad de proteasa alcalina.



3.3.3.- Estabilidad térmica de la actividad proteolítica.

La actividad de proteasa alcalina mostró ser estable a la temperatura, observando que a 60 °C conserva el 50 % de la actividad después de 1 h de incubación y a los 70 °C todavía conserva casi el 20 % de la actividad original, en el mismo tiempo (Figura 17).

Las proteasas alcalinas aisladas de *Bacillus* son en general termoestables (Keay, 1970). Takami y colaboradores (1989) aislaron una proteasa alcalina termoestable a 70 y 80 °C en presencia de Ca^{+2} . Algunas proteasas alcalinas necesitan este ion para su estabilidad a la temperatura y a la alcalinidad (Durham, 1987), mientras que hay reportes sobre proteasas alcalinas de *Bacillus stearothermophilus* que son naturalmente termoestables (Razak, 1994).

3.3.4.- Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad proteolítica.

Efectores potenciales de la actividad de proteasa alcalina fueron ensayados en las concentraciones que detalla la tabla de resultados (Tabla 11). El efecto inhibitorio más pronunciado fue el producido por el PMSF. Este inhibidor fue reportado como un inhibidor específico de la actividad de serina-proteasas, puesto que bloquea el sitio activo de las enzimas que poseen residuos del aminoácido serina en el mismo. (Keay, 1987; Markland, 1971).

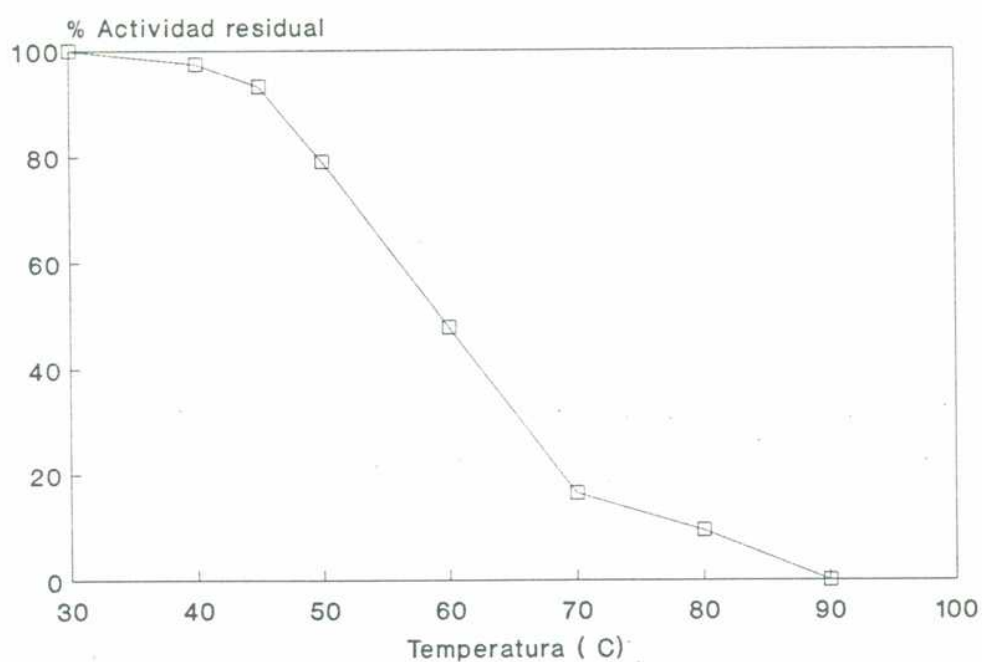


Tabla 11: Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasa alcalina.

Inhibidor	Concentración (mM)	% Actividad
control	-	100
EDTA	5,0	95,4
PMSF	2,5	41,7
SDS	3,5	78,9
urea	2000	91,2
HgCl ₂	2,0	98,6
CaCl ₂	5,0	102,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	40,0	91,5

* Actividad relativa al control (sin inhibidor).

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride.

SDS: Sodium dodecyl sulfates

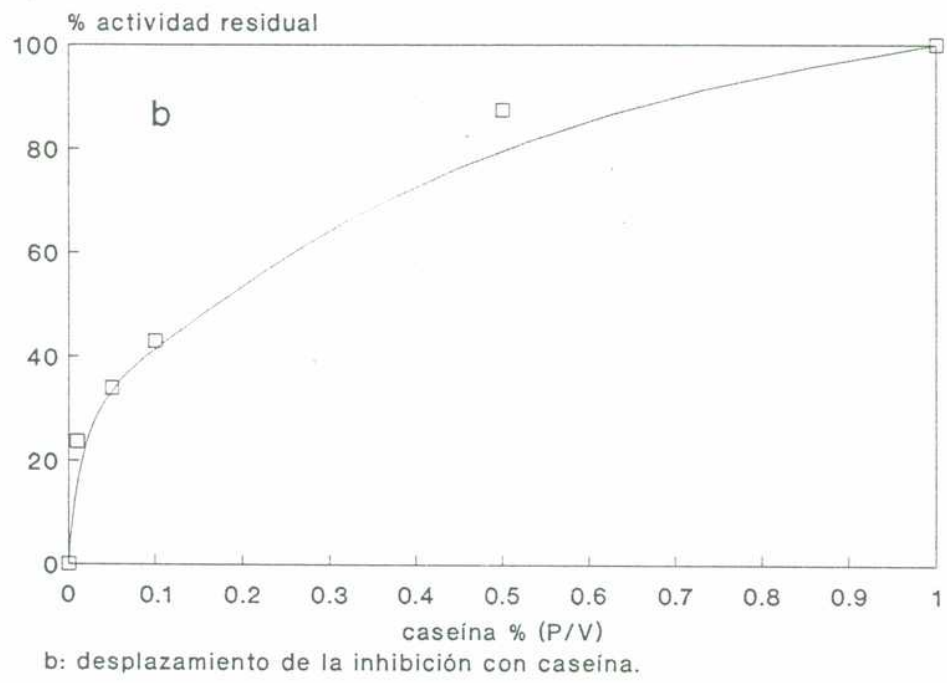
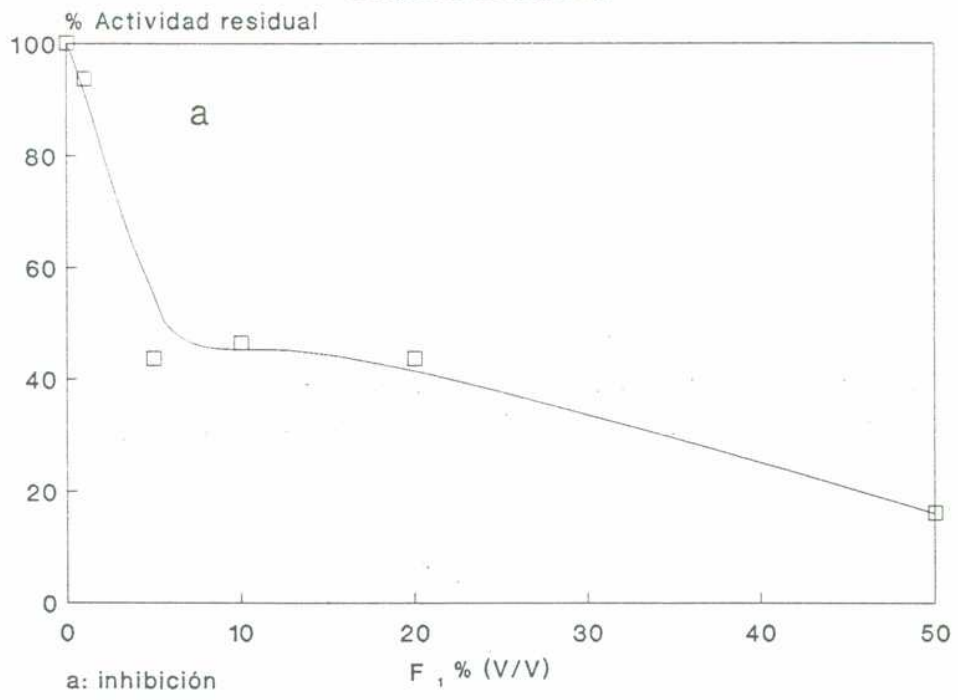
El SDS también ejerce un efecto inhibitorio, aunque no muy marcado, sobre la actividad de proteasa alcalina. El amonio no produce inhibición de la actividad proteolítica y este resultado es útil ya que en ensayos de producción utilizando amonio en diferentes concentraciones, el amonio reprimió la formación de proteasa alcalina exocelular. Con estos resultados confirmamos que el efecto del amonio podría ser el de una represión de la síntesis y exportación de la proteasa alcalina.

3.3.5.- Inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas pequeñas.

Existe una inhibición de la actividad de proteasa alcalina por moléculas de PM menores de 10 Kd. Esta fracción no fue caracterizada, pero podría incluir aminoácidos y péptidos de distintos tamaños, algunos de los cuales serían inhibidores enzimáticos (**Figura 18a-b**). La inhibición es reversible, puesto que la asociación enzima-inhibidor es separable y la actividad proteolítica se recupera. El 50 % de inhibición se obtiene con el 7,0 % V/V de estos componentes presentes en la solución sustrato de la enzima (F_1). Además, la inhibición es de tipo competitiva, puesto que concentraciones crecientes de caseína desplazan al inhibidor, revirtiendo su efecto.

Sorprendentemente, la curva de inhibición es bimodal. Se observa una fuerte inhibición a bajas concentraciones de F_1 y una suave inhibición a altas concentraciones de F_1 .

Figura 18a-b: Efecto de moléculas de PM < 10 Kd sobre la actividad de proteasa alcalina.



Podría pensarse en la existencia de dos enzimas con actividad de proteasa alcalina, con diferentes sensibilidades al efecto inhibitorio de las moléculas menores de 10 Kd.

Los productos de la acción de exoenzimas podrían reprimir la síntesis de la enzima, a semejanza de la inhibición por producto final de enzimas endocelulares anabólicas. La producción de proteasas exocelulares en *Bacillus* está regulada en este sentido y es fuertemente inhibida por la presencia de aminoácidos o péptidos en el medio (Doi, 1972). Aminoácidos individuales, no reprimen con igual eficiencia, ni el mismo aminoácido causa una represión efectiva en todas las especies. En *B. licheniformis* (Bernlohr, 1971) y *B. cereus* (Levisohn, 1967) la síntesis de proteasa está reprimida por altas concentraciones de aminoácidos exocelulares, pero en éstos y otros ejemplos similares, el mecanismo de inhibición permanece oscuro.

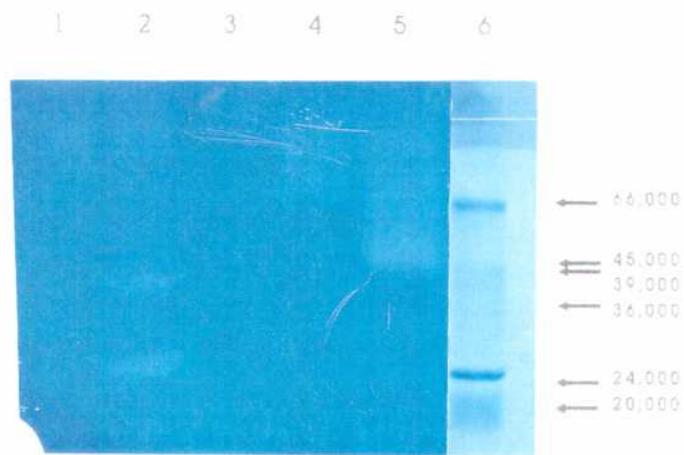
3.3.6.- Electroforesis.

Los ensayos electroforéticos permitieron revelar cuántas enzimas son responsables de la actividad de proteasa alcalina encontrada en la cepa MIR 29 y determinar el peso molecular aproximado de la/s proteasa/s aislada/s.

En la **Figura 19**, se observa que solo dos zonas del gel, evidencian actividad proteolítica. Ambas bandas se encuentran en un rango de PM entre 20 y 35 Kd. Los resultados fueron repetitivos, aún cuando el gel fue nativo

(sin SDS), llegando a la conclusión que al menos dos proteínas son responsables de la actividad de proteasa alcalina encontrada en la cepa MIR 29.

Figura 19: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.



4- CONCLUSIONES

1- El aislamiento de microorganismos de fuentes naturales, es el primer paso microbiológico en la búsqueda de productos naturales de interés industrial, tales como metabolitos secundarios y enzimas (Frankena y col., 1986). Es sabido que *Bacillus* es un género que secreta gran cantidad de exoenzimas de interés industrial, y por su gran variedad de habitats, pueden degradar todo tipo de sustratos (Priest, 1977).

La selección de microorganismos productores de proteasas fue dirigida a obtener cepas pertenecientes al género *Bacillus*, con características termorresistentes, alcalotolerantes e hiperproductoras de proteasa alcalina, ya que esta enzima es de gran aplicación industrial. Así fue aislada la cepa *Bacillus sp.* MIR 29, que puede crecer hasta 60 °C en medios sintéticos y hasta pH 9,0 en medios complejos.

B.licheniformis pertenece a uno de los 24 sub-grupos del grupo B (Priest, 1988), el grupo en estudio más numeroso, con diversos sub-grupos conteniendo microorganismos con una alta similitud con *B.subtilis* y *B.pumilus*. El sub-grupo 20 conformó la descripción estándar de *B.licheniformis*.

2- Con los ensayos realizados, se determinó que el mejor crecimiento microbiano y producción de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* MIR 29 es a 45 °C en medio sintético con 1,0 % de caseína a pH 7,5.

3- Diferentes fuentes de carbono ensayadas, mostraron diferentes niveles de producción de proteasa alcalina, cuando fueron seguidos los cultivos por lote con caseína, almidón, glicerol y glucosa. Con los resultados obtenidos, podemos concluir que la síntesis de proteasa alcalina en la cepa en estudio, no es constitutiva ya que se obtienen diferentes actividades específicas en diferentes condiciones de cultivo.

4- Además, es posible pensar en el papel de la caseína como inductor de la síntesis de proteasa alcalina, ya que la productividad específica (UPA/g o N° de células) es superior con caseína a cualquiera de las fuentes de carbono utilizadas.

5- En la cepa MIR 29 se confirma el concepto de represión catabólica de la síntesis de proteasa alcalina y de la esporulación (Priest, 1977; Dawes y col., 1970; Heineken y col., 1972; Basalp y col., 1992), ya que la aparición de la enzima en el cultivo ocurre en ausencia de glucosa produciéndose en bajas concentraciones en determinadas condiciones. Las células, incapaces de esporular en presencia de glucosa, no produjeron proteasa alcalina exocelular sino después de haberla consumido.

6- La fuente de nitrógeno también tiene influencia en la producción de proteasa alcalina. Todos los compuestos utilizados como fuentes de nitrógeno

soportaron el crecimiento microbiano, pero la producción de proteasa alcalina fue dispar en cada uno de ellos. La urea reprimió la síntesis de proteasas, mientras que concentraciones limitantes de amonio, permitieron una considerable producción enzimática. Se ha reportado en numerosos trabajos la represión de la formación de proteasa alcalina por amonio (Kole, 1988; Heineken y col., 1972). En la cepa MIR 29 se ha demostrado que la síntesis de proteasa alcalina es posible en concentraciones limitantes de amonio, mientras que un exceso de amonio en el medio, reprimió la síntesis y la exportación de proteasa alcalina exocelular.

7- El amonio causa inhibición de la producción de proteasas, cuando se lo utiliza como alcalinizante. Comparando los resultados obtenidos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Na}(\text{OH})$ como alcalinizantes, la producción de proteasa alcalina es inhibida en cultivos con caseína. En cultivos con glucosa, la utilización de uno u otro alcalinizante no variaron la producción de proteasa alcalina que fue, de todas maneras, basal.

8- Los perfiles de producción de proteasa alcalina exocelular en cultivo continuo con caseína, demuestran un papel inductor de la caseína, en las condiciones de cultivo ensayadas. La obtención de actividades de proteasa alcalina máximas a D intermedias, es un perfil típico de enzimas inducibles (Smith, 1972). Din y col. (1969) demostraron que hidrolizados de caseína en

ausencia de glucosa estimulan la formación de proteasas en *B. megaterium* KM. La utilización de caseína en los medios de cultivo mostró ser ventajosa para la producción de proteasa alcalina, desde el inicio del cultivo o adicionada a la fase de crecimiento exponencial.

Los ensayos de inducción de la caseína en la síntesis de proteasa alcalina, demostrada en presencia de streptomycin, descartan la posibilidad que la caseína sea un activador enzimático o participe en una modificación post-transcripcional de la proteasa alcalina. La misma induciría la transcripción o traducción de la proteasa alcalina, o sea, estaría involucrada en la síntesis *de novo* de la proteasa alcalina.

9- La eliminación de moléculas pequeñas del sobrenadante de cultivo produjo un incremento de la actividad proteolítica, fenómeno que puede deberse a la inhibición por productos de proteólisis. Aunque no han sido identificadas las moléculas inhibidoras, éstas podrían incluir aminoácidos y péptidos de diferentes tamaños. Ya fue reportado que la síntesis de proteasas exocelulares está regulada de este modo, a la manera de la inhibición por producto final de enzimas endocelulares anabólicas (Doi, 1972). Aunque cultivos con caseína producen péptidos y aminoácidos como consecuencia de la actividad proteolítica, estas moléculas son inmediatamente metabolizadas antes de cualquier efecto; sin embargo la inhibición fue observable en el extracto enzimático libre de células. Es claro que estas moléculas no

reprimieron la síntesis de proteasa alcalina sino que inhibieron su actividad *in vitro*.

10- Los estudios enzimáticos revelaron las siguientes características interesantes de la actividad de proteasa alcalina aislada de *Bacillus licheniformis* MIR 29:

- es una actividad mayoritariamente exocelular en determinadas condiciones de cultivo.

- tiene un pH y temperatura óptimas de actividad particularmente elevados: 12-13 y 60 °C, respectivamente, características que la hacen atractiva para su utilización en la industria de los detergentes.

- es resistente a condiciones desnaturalizantes como 0,5 % de SDS y 10,0 mM de urea.

- es una actividad proteolítica termoestable, reteniendo el 50 % de la misma por incubación a 60 °C por 1 h.

- es fácilmente purificable, utilizando la técnica de ultracentrifugación que además elimina productos que son inhibitorios de la actividad proteolítica.

11- Estudios electroforéticos revelaron que dos proteínas son responsables de la actividad de proteasa alcalina aislada en esta cepa. Los ensayos realizados para conocer algunas de las características fisicoquímicas de dicha actividad, no sugirieron la posibilidad de la existencia de dos enzimas.

Sólamamente en los ensayos de inhibición de la actividad proteolítica por moléculas < 10 Kd, la curva de inhibición bimodal sugirió la presencia de dos enzimas responsables de dicha actividad.

De los resultados obtenidos, se concluye que dos proteínas de PM aproximado entre 25 y 40 Kd, con similares características fisicoquímicas representan la actividad de proteasa alcalina encontrada en la cepa MIR 29, sugiriendo la posibilidad de que se trate de isoenzimas.

5. ABREVIATURAS.

Abs.: absorbancia

ATCC: American Type Collection Cultures

BSA: bovine serum albumin

C: carbono

CC: cultivo continuo

CL: cultivo por lotes

CLA: cultivo por lotes alimentado

D: velocidad de dilución del cultivo (h_{-1})

DFP: diisopropyl fluorophosphate

EDTA: ethylenediaminetetraacetyc acid

F: flujo de alimentación (ml/h)

g: gramos

GDO: D-glucosa, oxígeno 1-oxidorreductasa

h: hora

Kd: kilodalton

m: coeficiente de mantenimiento celular

M: molar

mA: miliamper

máx: máximo

mín: mínimo

N: nitrógeno

N: normal

NH₄: amonio

nm: nanometros

l: litros

P: producto

PDO: hidrógeno-peróxido óxidoreductasa

PMSF: phenylmethylnsulfonilfluoride

PSA: persulfato de amonio

rpm: revoluciones/minuto

S: concentración de sustrato

S₀: concentración inicial de sustrato

SDS: sodium dodecyl sulfate

T: temperatura

TCA: trichloroacetic acid

TEMED: N,N,N',N'-tetremethylethylenediamine

tpo: tiempo

V: volúmen del fermentador (ml)

vvm: volúmen de aire/volúmen de reactor/minuto

x: biomasa

x₀: biomasa inicial

Y_{x/s}: rendimiento en células del sustrato limitante

$Y_{p/s}$: rendimiento en producto del sustrato limitante

$Q_p X$: rendimiento en producto referido a biomasa

μ : velocidad de crecimiento específica (h^{-1})

μg : microgramos

6.- BIBLIOGRAFIA

- ANSON, M.L. (1938). Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**: 79-89.
- AUNSTRUP, K.; O. Andresen; E.A. Falch y T.K. Nielsen (1979) In: *Microbial Technology*, vol.1, Repler, H.J., Perlman, D. (eds.), p. 281, New York, Academic Press.
- BAILEY, R.W. y E.G. Scott (1966). *Diagnostic Microbiology*. C.V. Mosby Company, Inglaterra.
- BASALP, A.; G. Özcengiz y N.G. Alaeddinoglu (1992). Changes in patterns of alkaline serine protease and bacilysin formation caused by common effectors of sporulation in *Bacillus subtilis* 168. *Curr. Microbiol.* **24**: 129- 135.
- BERGMEYER, H.U.; J. Bergmeyer y M. Grasse (1984). *Methods in Enzymatic Analysis*, vol.5, Peptidases, Proteinases and their inhibitors, Verlag Chemie, Weinheim.
- BERKELEY, R.C.W.; N.A. Logan; L.A. Shute y A.G. Capey (1984). Identification of *Bacillus* species. In: *Methods in Microbiology*, vol. 16, Bergan (ed.) Academic Press, London, p. 291-328.
- BERNLOHR, R.W. y V. Clark (1971). Characterization and regulation of protease synthesis and activity in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.*, **105**: 276-283.

- BONDE, G.J. (1981). *Bacillus* from marine habitats: allocation to phenotypes established by numerical techniques. In: *The Aerobic Endospore-forming Bacteria*. Berkeley and Godfellow (eds.), p. 181-215, London, Academic Press.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248- 254.
- BROCK, T. D. (1978). *Biología de los microorganismos*, 2a. ed., Barcelona, Editorial Omega.
- BURNETT, T.J.; G.W. Shankweiler y J.H. Hageman (1986). Activation of intracellular serine proteinase in *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol.*, **165**, 1: 139-145.
- CASTRO, G.R.; M.A. Ferrero; B. Mendez y F. Siñeriz (1991). A system for the differentiation of some closely related *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* **20**, 105-108.
- CASTRO, G.R.; M.A. Ferrero; B.S. Méndez y F. Siñeriz (1993). Screening and selection of bacteria with high amylolytic activity. *Acta Biotechnol.* **13**, 2, 197-201.
- CLARKE, P.H., M.A. Houldsworth y M.D. Lilly (1968). Catabolite repression and the induction of amidase synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* 8602 in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 225.

- COLWELL, R.R.; W.A. Wood; N.R. Krieg y G. Briggs Philips (1981). *Manual Methods of General Bacteriology*. ASM, Washington DC, p.-444-449.
- CUTTING, S.M. y P.B. Vander Horn (1990). Genetic Analysis. In: *Molecular Biological Methods for Bacillus*, C.R. Harwood y S.M. Cutting (eds.), England, John Wiley & Sons.
- DANCER, B.N. y J. Mandelstam (1975). Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, vol. 121, 2, 406-410.
- DAWES, I. W. y J. Mandelstam (1970). Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *J. Bacteriol.* 103, 3: 529-535.
- DAWSON, P.S.S. (1985). Continuous cultivation of microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2, 4: 315-372, CRC Press.
- DIN, F.U. y J. Chaloupka (1969). Amino acid stimulation of proteinase synthesis in an asporogenous *Bacillus megaterium* Km. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 233-238. Rev. Biotechnol., vol.2 4, 315-372, CRC Press.
- DOI, R.H. (1972). Role of proteases in sporulation. *Curr. Top. Cell Regul.* 6, 1-20.
- Enzyme Nomenclature: Recommendation of the International Union of Biochemistry, New York, Academic Press 1978.

- DURHAM, D.R.; D.B. Stewart y E.J. Stellwag (1987). Novel Alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.*, vol. 169, 6: 2762-2768.
- FAHMY, F. ; J. Flossdorf y D. Clauss (1985). The DNA base composition of the type strains of the genus *Bacillus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 60-65.
- FERRARI, E.; S.M.H. Howard y J.A. Hoch (1986). Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.* vol. 166, 1: 173-179.
- FRANKENA, J.; G.M. Koningstein; H.W. Verseveld van y A.H. Stouthamer (1986). Effect of different limitations in chemostat culture on growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 106-112.
- GIESECKE, U.E.; G. Bierbaun; H. Rudde; U. Spohn y C. Wandrey (1991). Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 720-724.
- GORDON, R.E. (1977). The Genus *Bacillus*. In: Handbook of Microbiology, Laskin, A y H.A. Lechevalier (eds.), 1, 319-336. CRC. Press, Boca Raton, U.S.A.
- GORDON, R.E. y W.C. Haynes (1973). The genus *Bacillus*. Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- GORDON, R.E. (1981). One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. In: The Aerobic Endosporeforming Bacteria. Berkeley and Goodfellow (eds.), p. 1-15, London, Academic Press.

- HEINEKEN, F.G.; R.J. O'Connor (1972). Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *J. Gen. Microbiology*. **73**, 35-44.
- HOBBS, G. y T. Cross. (1983). Identification of endospore-forming bacteria. In: *The Bacterial Spore*, vol. 2, Hurst and Gould (eds.), p. 49-78, London, Academic Press.
- HUNGATE, R.E. (1962). Ecology of bacteria, In: *The bacteria*, vol.IV, I.C.Gunsalus and R.Y. Stanier (eds.), p. 95-119. New York, Academic Press.
- JENSEN, D. E. (1972). Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two- stage fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 647-662.
- KALISZ, H.M. (1988). Microbial Proteinases. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 36, Fiechter, A. (ed.) p. 1-61, Berlin, Springer-Verlag.
- KEAY, L. y B.S. Wildi (1970). Proteases of the Genus *Bacillus* .I. Neutral proteases. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 179-212.
- KEAY, L.; P.W. Moser y B.S. Wildi (1970). Proteases of the Genus *Bacillus*. II. Alkaline proteases. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 213-249.
- KOLE, M. M.; I. Draper y D.F. Gerson (1988). Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 404- 408.

- KORNBERG, A.; J.A. Spudich; D.L. Nelson y M.P. Deutscher (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 51.
- LELIEVELD, H. L. M. (1982). The use of continuous culture for selection and isolation of microorganisms producing extracellular enzymes adapted to extreme environments. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1419- 1425.
- LEVISOHN, S. y A.I.Aronson (1967). Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **121**: 823-834.
- LOGAN, N.A. y C.W. Berkeley (1984). Identification of *Bacillus* strains using API system. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, **7**: 1871-1882.
- LOPEZ, J.M.; B. Uratani- Wong y E. Freese (1980). Catabolite repression of enzyme synthesis does not prevent sporulation. *J. Bacteriol.* **141**, **3**: 1447- 1449.
- MC FADDIN, J.F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- MAO, W.; R. Pan y D. Freedman (1992). High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. *J. Ind. Microbiol.*, **11**: 1-6.
- MARKLAND, F.S. y E.L.Smith (1971). Subtilisins: Primary structure and physical properties. In: The enzymes, vol.3, P.D. Boyer (ed.), p. 561-608, New York, Academic Press.

- MATIN, A. (1981). Regulation of enzyme synthesis as studied in continuous culture. In: Continuous Culture of Cells, vol. II, P.H. Calclott (ed.), cap. 3, p. 69-97, Boca Raton, CRC Press.
- MAURIZI, M.R. y R.L. Switzer (1980). *Curr. Top. Cell. Regul.*, **16**, 163.
- MORGAN, F.J.; K.R. Adams y F.G. Priest (1979). A culture method for the detection of pullulan-degrading enzymes in bacteria and its application to the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **46**: 291-294.
- MORIHARA, K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv. Enzymol.*, **41**, 179.
- O.M.S.(1977). Expert Comitte on Biological Standardization. *Technical Report Series*. **610**: 98-118.
- PIRT, S.J. (1975). Batch culture and plug-flow culture. In: Principles of Microbes and Cell Cultivation. Blackwell (ed.),p. 33, Oxford.
- PRIEST, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711- 753.
- PRIEST, F.G.; M. Goodfellow y C. Tood (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1847-1882.
- PRIEST, F.G. (1989). Products and applications. In: *Bacillus*, Harwood C.R. (ed.), p. 293-320, New York-London, Plenum Press.

- RAZAK, N.A.; M.Y.A. Samad; M. Basri; W.M.Z.W. Yunus; K. Ampon y A.B. Salleh (1994). Thermostable extracellular protease of *Bacillus stearothermophilus*: factors affecting its production. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* **10**: 260-263.
- REYSETT, G. y J. Millet (1972). Characterization of an intracellular protease in *Bacillus subtilis* during sporulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**: 328-334.
- SCHAEFFER, P. (1969). Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and endotoxins. *Bacteriol. Rev.* **33**: 48-71.
- SIERRA, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* **23**: 15-22.
- SMITH, B y J. Roe (1949). A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. *J. Biol. Chem.* **179**: 53-59.
- SMITH, N.R.; R.E. Gordon y F.E. Clark (1952). Aerobic spore-forming bacteria. U.S. Dept. of Agric., Washington D.C. Agric. Monogr. **16**.
- SMITH, P.B.; G.A. Handcock y D.L. Rhoden (1969). Improved medium for detecting deoxiribonuclease-producing bacteria. *Appl. Microbiol.* **18**: 991-993.
- SMITH, R.W. y A.C.R. Dean (1972). β -galactosidase synthesis in *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 37.

- SNEATH, P. H. A. (1986). Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Butler, J. P. (ed.). Sect. 13, p. 1104-1139, Baltimore, Williams & Wilkins.
- SKIPPER, N.; M. Sutherland; R.W. Davies; D. Kilburn; R.C. Miller Jr.; A. Warren y R. Wong (1985). Secretion of bacterial cellulase by yeast. *Science* **230**: 958-960.
- TAKAMI, H.; T. Akiba y K. Horikoshi (1987). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No.-AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 120-124.
- TEMPEST, D.W. y J.T.M. Wouters (1981). Properties and performance of microorganisms in chemostat culture. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **3**: 283- 290.
- TRINDER, P. (1969). *Annal. Clin. Biochem.*, **6**, 24.
- TSAI, Ying-Chie y col. (1988). Production and further characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. *Appl. Envirom. Microbiol.*, vol. 54, 12, 3156-3161.
- VASANTHA, N. y E. Freese (1980). Enzyme changes during *Bacillus subtilis* sporulation caused by deprivation of guanine nucleotides. *J. of Bacteriol.*, vol. 144, **3**, 1119-1125.
- WARD, O.P. (1983). Proteinases, In: Microbial Enzymes and Biotechnology , W.M. Fogarty (ed.), p. 251-317. London, Applied Science.
- WOLF, D.H. (1980). *Adv. Microb. Physiol.* **21**, 267.

WOLF, D.H. (1982). *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 35.

WOOD, D.A. (1978). *Bull. Br. Mycol. Soc.*, **12**, 120.

ZHANG, Q.; N. Tsukagoshi; S. Miyashiro y S. Udaka (1983). Increased production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Appl. Envirom. Microbiol.*, **46**, 1: 293-295.