

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA PROTEASA
PRODUCIDA A PARTIR DE *Bacillus licheniformis* LB05**

POR

Q.B.P. JOSÉ ALBERTO BELTRÁN BUSTOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

Vo.Bo.

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Director

JUNIO, 2024

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA PROTEASA
PRODUCIDA A PARTIR DE *Bacillus licheniformis* LB05”**

Aprobación de la Tesis:

DR. EDGAR ALLAN BLANCO GÁMEZ
Presidente

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU
Secretario

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
Vocal

DRA. MARIA ELENA CANTU CARDENAS
Sub-Directora de Posgrado

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA PROTEASA
PRODUCIDA A PARTIR DE *Bacillus licheniformis* LB05”**

Revisión de la Tesis:

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
Comité Tutorial

DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS
Comité Tutorial

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU
Comité Tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

Q.B.P. José Alberto Beltrán Bustos

**Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Título del estudio: "Caracterización bioquímica de la enzima proteasa
producida a partir de *Bacillus licheniformis* LB05"**

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en
Microbiología Aplicada**

Número de páginas: 51

Director de Tesis: Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

En la actualidad el valor estimado de las ventas mundiales de enzimas industriales es de 3 mil millones de dólares, siendo las enzimas proteolíticas las que mayormente se comercializan. Debido a la gran demanda que existe en el mercado industrial, la búsqueda para su obtención ha incrementado exponencialmente. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar bioquímicamente una nueva proteasa extracelular producida a partir de *B. licheniformis* LB05. La enzima fue purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio iónico y se determinó su peso molecular mediante SDS-PAGE. Se evaluaron parámetros como el pH y la temperatura óptimos de actividad, así como la estabilidad frente a diversos inhibidores y surfactantes aniónicos como iónicos. Los resultados revelaron que la proteasa presenta un peso molecular de 66 kDa, una actividad óptima a pH 11.0 y 70°C, manteniendo estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura. La inhibición por PMSF confirmó que se trata de una serina proteasa. En conclusión, la serina proteasa producida por *B. licheniformis* LB05 presenta propiedades para aplicaciones industriales, especialmente en ambientes con condiciones extremas de pH y temperatura.

Firma del asesor: 
Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por haberme otorgado la oportunidad de poder realizar el presente proyecto de investigación bajo su dirección. También, le agradezco enormemente los consejos, la confianza, el apoyo y las oportunidades brindadas durante mi estancia en posgrado.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de poder continuar mi formación académica en la Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante los dos últimos años.

Agradezco al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por permitirme realizar los experimentos necesarios del proyecto de investigación en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. También, le agradezco al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos y al Dr. Ulrico Javier López Chuken por la ayuda y consejos brindados en mi paso por posgrado.

Por último, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que han estado conmigo a lo largo de estos dos últimos años porque aunque este sea un objetivo académico, a lo largo del trayecto se presentan dificultades que no se hubieran superado sin todos ellos. Primeramente, quiero agradecer infinitamente a mis amados padres, José Ramón y Alma Lorena por creer en mí, por su amor y apoyo incondicional. A mi hermana, Ma. Fernanda por su constante motivación y consejos brindados y a mi sobrino, Erick Alexis por hacerme la vida más feliz. También, quiero agradecer a mis mejores amigos, Itzel, Sandra, Adal, Rodrigo, Janis, Roberto Manuel, Sofía, Eduardo, Isis y Rogelio Miguel por sus consejos, su compañía y por hacerme la vida más fácil.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	9
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Enzimas hidrolíticas	11
1.2. Enzimas proteolíticas	12
1.2.1. Exoproteasas	12
1.2.2. Endoproteasas.....	13
1.2.3. pH	14
1.3. Principales fuentes de enzimas proteolíticas	14
1.3.1. Plantas.....	14
1.3.2. Animales	15
1.3.3. Microorganismos.....	15
1.4. Género <i>Bacillus</i> como fuente principal de proteasas	16
1.4.1. Importancia de <i>B. licheniformis</i> en la biotecnología	17
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	17
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	19
CAPÍTULO 4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	20
4.1. Hipótesis	20
4.2. Objetivos	20
4.2.1. Objetivo general.....	20
4.2.2. Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Material biológico, reactivos y equipos de laboratorio.....	21
5.1.1. Material biológico	21
5.1.2. Reactivos	21
5.1.3. Equipos.....	22
5.2. Métodos	23
5.2.1. Propagación de la cepa de <i>B. licheniformis</i> LB05.....	23

5.2.2. Producción de la enzima proteolítica por fermentación sumergida.....	23
5.2.3. Ensayo cuantitativo para determinar la actividad proteolítica	23
5.2.4. Determinación de concentración de proteínas totales	24
5.2.5. Determinación del crecimiento microbiano	25
5.2.6. Determinación del perfil de comportamiento de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH.....	25
5.2.7. Determinación de la estabilidad de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH	26
5.2.8. Efecto de inhibidores y surfactantes sobre la actividad de la proteasa. 26	
5.2.9. Ultrafiltración	27
5.2.10. Cromatografía de permeación en gel e intercambio iónico.....	27
5.2.11. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	27
5.2.11.1. Tinción de plata.....	28
5.2.12. Zimograma.....	28
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> LB05	29
6.2. Curva estándar de tirosina	30
6.3. Ensayo cuantitativo para determinar la actividad proteolítica, proteína total y crecimiento bacteriano	31
6.4. Determinación del perfil de comportamiento de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH.....	34
6.5. Determinación de la estabilidad de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH.....	36
6.6. Efecto de inhibidores y surfactantes sobre la actividad proteolítica	38
6.7. Concentración de proteasa por ultrafiltración.....	42
6.8. SDS- PAGE y Zimograma.....	43
6.9. Cromatografía de permeación de gel e intercambio iónico	44
CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN	46
7.1. Recomendaciones y perspectivas.....	47
BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las enzimas tipo proteasas (Sharma, <i>et al.</i> 2019).	10
Figura 2. Clasificación de enzimas proteolíticas (Kotb, <i>et al.</i> 2023).	12
Figura 3. Mecanismo de acción por aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Mótyán, <i>et al.</i> 2013).	13
Figura 4. Morfología macroscópica de <i>B. licheniformis</i> LB05 en agar nutritivo. ...	30
Figura 5. Morfología microscópica de <i>B. licheniformis</i> LB05. Tinción de Gram. Observado a 100x.	30
Figura 6. Curva estándar de tirosina y ecuación de la recta.	31
Figura 7. Relación de la concentración de proteína total y la actividad enzimática con respecto al tiempo.	32
Figura 8. Relación de la actividad enzimática y el crecimiento bacteriano con respecto al tiempo.	33
Figura 9. Perfil de comportamiento de la actividad enzimática a diferentes temperaturas (°C).	34
Figura 10. Perfil de comportamiento de la actividad enzimática a diferentes pH. .	36
Figura 11. Relación de la actividad enzimática total y la estabilidad utilizando diferentes temperaturas (°C).	37
Figura 12. Relación de la actividad enzimática total y la estabilidad utilizando diferentes pH.	38
Figura 13. Zimografía de una enzima proteolítica de la cepa LB05 de <i>B. licheniformis</i> . 1. Enzima proteolítica comercial de <i>B. licheniformis</i> . 2. Extracto crudo (48 h). 3. Extracto crudo (72 h). 4. Extracto crudo con EDTA (5 mM). 5. Extracto crudo con 1,10- fenantrolina (20 mM). 6. Extracto crudo con PMSF (5mM).	42
Figura 14. (a) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%). 1. Marcador de peso molecular (66,000-6,500 kDa). 2. Extracto crudo (72 h). 3. Extracto filtrado (100 kDa). 4. Extracto retenido (30 kDa). 5. Enzima proteolítica comercial (<i>B. licheniformis</i>). (b) Zimograma de extracto retenido (30 kDa).	44
Figura 15. (a) Fracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel y por (b) cromatografía de intercambio iónico. Agar bacteriológico al 10% con leche descremada.	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fórmulas matemáticas para determinar la actividad enzimática total (U), específica (U/mg) y residual (%) (Montes, 2020).	24
Tabla 2. Amortiguadores utilizados para determinar el perfil de comportamiento de la enzima a diferentes pH (Montes, 2020).....	25
Tabla 3. Detergentes utilizados para determinar la resistencia de la enzima a diferentes concentraciones (Montes, 2020).....	26
Tabla 4. Composición de los geles de poliacrilamida (Silva, 2020).	27
Tabla 5. Composición de soluciones químicas utilizadas en la tinción de plata (Silva, 2020).	28
Tabla 6. Composición para la tinción de azul de Coomassie y solución para desteñir (Montes, 2020).	29
Tabla 7. Efecto de distintos detergentes e inhibidores de enzimas proteolíticas sobre la actividad enzimática.	40
Tabla 8. Comparación de la actividad enzimática (U/mL), proteína total (mg/mL) y actividad específica (U/mg) mediante ultrafiltración.	42

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las proteasas o también conocidas como enzimas proteolíticas pertenecen al grupo de enzimas comerciales mundialmente más importante debido a sus diversas aplicaciones en los distintos sectores industriales [1]. El valor estimado actual de las ventas mundiales de enzimas industriales es de tres mil millones de dólares. De las cuales, el 75% son enzimas hidrolíticas, por ejemplo, lipasa, proteasa y amilasa, siendo las enzimas proteolíticas las que mayormente se comercializan, ya que representan alrededor del 60% de la venta total mundial de enzimas [2]. Hoy en día, son especialmente utilizadas en diferentes tipos de industrias, como la farmacéutica, alimentaria, cosmética, textil y cuero y en la de detergentes [3].

Este tipo de enzimas se encargan de hidrolizar proteínas o péptidos. Es decir, rompen los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos en una molécula de proteína, obteniendo la formación de péptidos y aminoácidos más cortos [4]. De forma general, las proteasas se pueden clasificar en dos grupos, exopeptidasas y endopeptidasas (Fig. 1) [5]. Las exopeptidasas, actúan cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas, de acuerdo con su sitio de acción, ya sea en el C o N terminal. Lo cual, se derivan dos clases, carboxipeptidasas y aminopeptidasas. En cambio, las endopeptidasas, se caracterizan por actuar sobre los enlaces peptídicos que se encuentran dentro de la cadena polipeptídica, alejados de los extremos terminales. Según su mecanismo catalítico, se dividen en cuatro subgrupos: serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas [6].

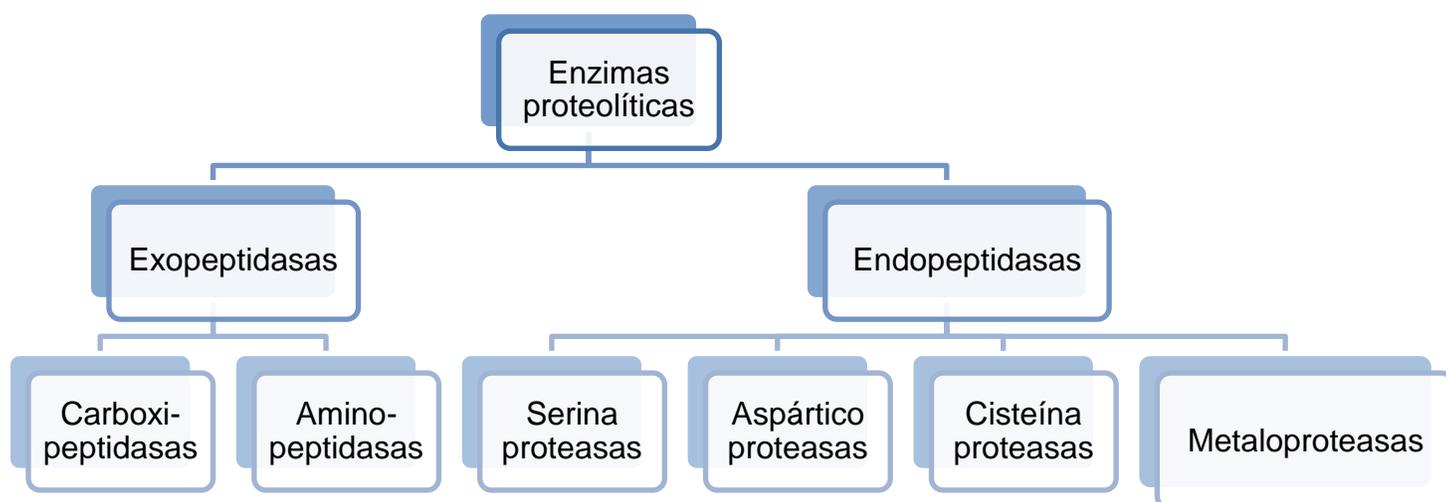


Figura 1. Clasificación de las enzimas tipo proteasas (Sharma, *et al.* 2019).

Debido a la gran demanda que existe de enzimas proteolíticas en el mercado industrial actualmente, la búsqueda para su obtención ha incrementado exponencialmente [7]. Las principales fuentes son de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, la producción de enzimas a partir de fuentes animales y vegetales se ha visto limitada debido a cuestiones éticas, razones medioambientales y procesos de producción de baja eficiencia [8]. Es por eso que las enzimas proteolíticas que provienen de una fuente microbiana son de mayor interés comercial debido a su alto rendimiento, menor consumo de tiempo, menor requerimiento de espacio, elevada manipulación genética y rentabilidad. Estas características hicieron que los microorganismos sean la mejor opción para producir proteasas para su uso en aplicaciones industriales [9]. De acuerdo con investigaciones realizadas anteriormente, se ha reportado que muchos microorganismos son capaces de producir proteasas, como bacterias, hongos y virus [10]. Sin embargo, las bacterias son uno de los grupos más utilizados para la producción de proteasas, especialmente el género *Bacillus* por la alta capacidad de secreción de proteínas y su amplio rango de actividad y estabilidad de pH y temperatura que poseen algunas de las especies del género *Bacillus*, como es el caso de *B. licheniformis* y *B. subtilis* [11]. También, se han caracterizado por producir proteasas alcalinas. Las proteasas alcalinas son activas en un rango de pH que va desde neutro a alcalino y pueden llegar a identificarse como serina proteasa o metaloproteasa. Este grupo de enzimas es uno de los más estudiados debido a sus importantes aplicaciones en las industrias [12].

En el presente trabajo, se llevara a cabo la caracterización bioquímica de una enzima tipo proteasa a partir de la cepa LB05 de *B. licheniformis* con posibles aplicaciones industriales.

1.1. Enzimas hidrolíticas

Las enzimas hidrolíticas son aquellas enzimas que catalizan reacciones mediante la incorporación de una molécula de agua para llevar a cabo la descomposición del sustrato. Algunas de las hidrolasas más utilizadas son esterasas, proteasas, glucosidasas y lipasas. Esta clase de enzimas son de gran importancia comercial debido a sus múltiples aplicaciones en diversos sectores industriales, como detergentes, cuero, textiles, pulpa y papel, alimentos, lácteos, biocombustibles y tratamiento de residuos. Es por eso que representan el 70% de las ventas totales de enzimas industriales [13]. Sin embargo, las proteasas son las enzimas que dominan el mercado comercial en mayor proporción, ya que representan el 60% de las ventas totales de enzimas en todo el mundo [14].

1.2. Enzimas proteolíticas

De forma particular, las proteasas producen la hidrólisis de compuestos proteicos convirtiéndolos en péptidos más cortos o en residuos de aminoácidos libres. De acuerdo con Kotb y colaboradores (2023), estas enzimas se pueden llegar a clasificar de distintas formas, como se muestra en la Figura 2 [14].

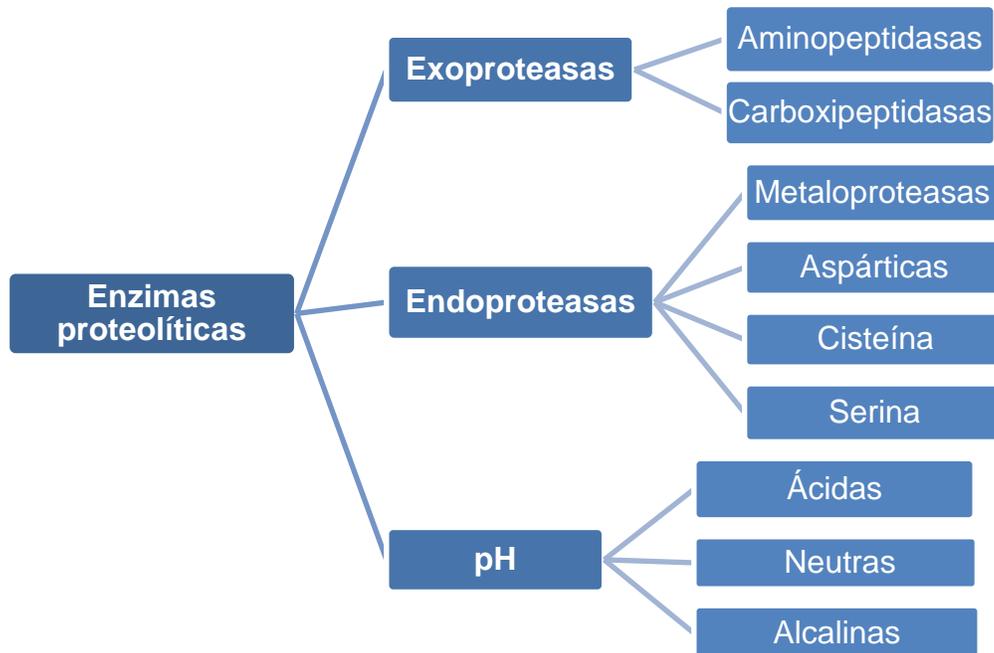


Figura 2. Clasificación de enzimas proteolíticas (Kotb, *et al.* 2023).

1.2.1. Exoproteasas

Las exopeptidasas se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos, se encuentran cerca de los extremos C o N terminal del sustrato. Además, se conocen dos clases principalmente: carboxipeptidasas o aminopeptidasas, como se observa en la Figura 3 [15].

Las aminopeptidasas se inclinan hacia el N- terminal libre de la cadena polipeptídica liberando un dipéptido, un tripéptido o aminoácido individual. En el caso de las carboxipeptidasas, llevan a cabo la reacción del lado del C- terminal liberando un dipéptido y aminoácidos individuales. Generalmente, este tipo de enzimas son intracelulares y se encuentran en diferentes microorganismos, como hongos y bacterias [2, 15].

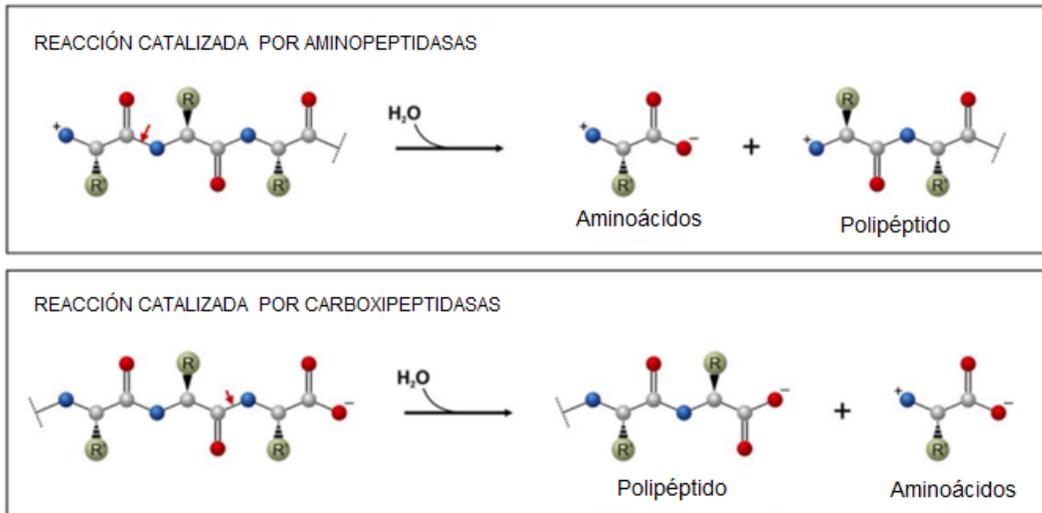


Figura 3. Mecanismo de acción por aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Mótyán, *et al.* 2013).

1.2.2. Endoproteasas

Las endoproteasas se encargan de romper los enlaces peptídicos que se encuentran lejos de los extremos terminales y se caracterizan por presentar un grupo funcional en su sitio activo. Se conocen cuatro clases, serina, aspártico, cisteína y metaloproteasas [2, 16].

1.- **Serina proteasas:** se caracterizan por presentar un residuo Ser (serina) en el sitio activo de la enzima. Se encuentra presente en muchas clases de organismos, incluidos en algunos genomas virales. Las serina proteasa representan un tercio del total de las enzimas proteolíticas que se conocen en la actualidad.

2.- **Proteasas aspárticas:** presentan un par de aspartatos en el sitio activo. Esta clase de proteasas se caracterizan por encontrarse principalmente en pH ácido de diversas fuentes, ya sea de animales, plantas o microorganismos.

3.- **Cisteína proteasas:** se conoce que esta clase de proteasas presentan residuos de cisteína en su sitio activo. Se ha reportado que se desarrollan principalmente en un pH neutro a temperaturas elevadas (50 a 70°C). Se encuentran en una gran variedad de organismos procarióticos como en eucariotas.

4.- **Metaloproteasas:** presentan iones metálicos en su sitio activo y se caracterizan por presentar zinc. Se encuentra distribuido en una gran variedad de hongos y bacterias con pH de 5 a 9 [2, 16].

1.2.3. pH

1.2.3.1. Proteasas ácidas

Las proteasas ácidas se encuentran activas en un pH de 3.8 a 5.6. Regularmente, son utilizadas para la elaboración de salsas de soya, producción de condimentos, para aclarar la cerveza y los jugos de frutas. Principalmente, este tipo de enzimas extracelulares, se extrae de diferentes especies de hongos como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. fumigatus* y *A. saitoi*. En esta categoría se encuentran principalmente las proteasas aspárticas [7].

1.2.3.2. Proteasas neutras

Las proteasas neutras son estables y activas en pH neutro o débilmente ácido o débilmente alcalino (5 a 8). La gran mayoría de este tipo de enzimas proteolíticas pertenece a la clase de metaloproteasas y pertenecen al género *Bacillus*. Su principal utilidad es generar menos amargor en la hidrólisis de proteínas alimentarias debido a una velocidad de reacción media [7].

1.2.3.3. Proteasas alcalinas

Las proteasas alcalinas son activas en un pH alcalino que va desde 8 a 12. Esta característica, hace que sea una de las enzimas más utilizadas en industrias como la fabricación de detergentes, la producción de alimentos, la síntesis de péptidos, el procesamiento del cuero, el desgomado de la seda y la gestión de residuos. Llegando a representar una cuarta parte de las ventas totales de enzimas en todo el mundo. Las especies de *Bacillus* son una de las fuentes más explotadas comercialmente para producir proteasas alcalinas debido a las enormes cantidades de enzima secretada con alta actividad enzimática. Además de *Bacillus*, se han encontrado proteasas alcalinas de bacterias como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Vibrio* y hongos del género *Aspergillus*. Principalmente se encuentran proteasas que presentan un residuo de serina en su sitio activo [7, 17].

1.3. Principales fuentes de enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas realizan distintas funciones fisiológicas en los organismos vivos y por lo tanto, están presentes en distintas fuentes como plantas, animales y microorganismos [18].

1.3.1. Plantas

Las plantas se han llegado a utilizar como una fuente para la producción de proteasas, sin embargo, depende de diversos factores como la accesibilidad de la

tierra destinada al cultivo y de las adecuadas condiciones climáticas que se requieran para su buen crecimiento. Además, para llevar a cabo la producción de proteasas a partir de las plantas se requiere mucho tiempo [2]. Las enzimas proteolíticas más conocidas que provienen de una fuente vegetal son bromelina (*Ananas comosus*), la ficina (*Ficus caric*) y la papaína (*Carica papaya*) [18]. Se caracterizan por presentar propiedades para coagulación de la leche y digestión de proteínas con un amplio rango de pH (5 a 10). La bromelina es una proteasa vegetal que se obtiene de la hoja, el jugo, el tallo y la cáscara de la piña. En el caso de la papaína, se extrae del fruto, raíz y hojas de la planta de papaya [19]. La ficina se encuentra en el látex de los higos y es una de las proteasas de origen vegetal más prometedoras, debido a que también se puede utilizar como agente resistente al frío para la cerveza, acondicionador de masa, sustituto del cuajo y coadyuvante de procesamiento para cereales precocidos [20].

1.3.2. Animales

Se han reportado enzimas proteolíticas que se originan en animales, las más conocidas son la tripsina, la quimotripsina, la pepsina y la renina. La tripsina, es secretada a través del páncreas y actúa como una enzima digestiva intestinal. Se encarga de la hidrólisis de las proteínas alimentarias. Se ha reportado su uso en distintas aplicaciones como el control biológico de insectos y plagas. De la misma forma, la quimotripsina se encuentra naturalmente en el páncreas de animales. Sin embargo, esta enzima se utiliza en aplicaciones analíticas y de diagnóstico. En el caso de la pepsina, se produce en el estómago de aproximadamente todos los vertebrados y tiene una naturaleza ácida. En la industria láctea, se utiliza para la formación de cuajada estable con sabor de alta calidad. Por último, la enzima renina, es una proteasa aspártica encontrada en el cuajo y es utilizada principalmente en la fabricación del queso [2, 18].

1.3.3. Microorganismos

Los microorganismos producen enzimas con mayor facilidad y rapidez que las células que provienen de animales y plantas. Además la producción no se ve afectada por factores externos, como las condiciones climáticas o los cambios estacionales ni por cuestiones éticas relacionadas con el sacrificio de animales [11]. Las enzimas proteolíticas a partir de fuentes microbianas han llamado la atención por su potencial biotecnológico en distintos procesos industriales, debido a que se pueden producir en gran escala mediante distintos métodos de fermentación, ya sea en estado líquido o sólido. Generalmente, las proteasas de origen microbiano son extracelulares, lo que significa, que los microorganismos secretan directamente la enzima en el medio de fermentación. De esta forma,

hace que el proceso de producción sea más fácil y menos costoso en comparación con otras fuentes de enzimas [21].

1.3.3.1. Hongos

Las proteasas producidas a partir de hongos son de gran interés debido a su amplia especificidad de sustrato, estabilidad en condiciones desfavorables, alta diversidad y facilidad para la separación del micelio obtenido en el medio de cultivo [2]. Además, los hongos generalmente se consideran organismos GRAS (generalmente considerados seguros). Debido a que cumplen con los requisitos que requieren las diferentes industrias, como el crecimiento eficiente en medios de cultivo en menor tiempo y el suministro continuo de los productos deseados [22]. Se han aislado proteasas de diferentes hongos como *Pleurotus ostreatus*, *A. flavus*, *Candida mogii*, *Thermomyces lanuginosus*, entre otros [3].

1.3.3.2. Bacterias

Las enzimas proteolíticas producidas por bacterias son las que presentan mayor importancia comercial, ya que son utilizadas en diferentes procesos industriales. Debido a que proporcionan propiedades que les permiten ser modificadas genéticamente y de esta forma poder adaptarse a diversas aplicaciones [23]. El género de *Bacillus* es la fuente más destacada debido a la capacidad de secreción de proteínas que poseen varias especies de *Bacillus*. Además, se producen proteasas neutras y alcalinas [24]. Las proteasas que son de naturaleza alcalina son las más utilizadas debido a sus diferentes aplicaciones en las industrias como en la formulación de detergentes, en la industria alimentaria, farmacéutica, entre otras [25]. Las especies de *Bacillus* más utilizadas son *B. subtilis* y *B. licheniformis* [2]. Además, la administración de alimentos y medicamentos les ha conferido el estado GRAS [11].

1.4. Género *Bacillus* como fuente principal de proteasas

El género de *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, uno de los géneros más antiguos [11]. Las especies de *Bacillus* se caracterizan por presentar la capacidad de desarrollarse en diferentes tipos de hábitats, tanto en ecosistemas acuáticos, como terrestres e incluso en ambientes bajo condiciones extremas. Entre las principales características del género *Bacillus* es que pueden crecer en condiciones aerobias o anaerobias facultativas, son Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar y pueden llegar a medir de 0.5 a 10 μm , su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro en un rango de temperaturas de crecimiento que va desde 30 a 45°C. Además, las especies de *Bacillus* se destacan por producir

endosporas, lo que les otorga la capacidad de poder subsistir en los diferentes tipos de ecosistemas [26].

El género de *Bacillus* es uno de los grupos más importantes en la biotecnología industrial por las enzimas que produce debido a que se caracterizan por desarrollarse en presencia de valores altos de pH y temperatura [27]. Algunas de ellas, son las enzimas proteolíticas extracelulares que presentan un papel importante en el mercado por su desempeño en diversos sectores, como en las industrias de alimentos, bebidas, cuero, farmacéutica, médica y de detergentes [11].

1.4.1. Importancia de *B. licheniformis* en la biotecnología

B. licheniformis se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como en aguas termales, suelos contaminados, compostas, plumas de aves, cuero, superficies rocosas, en lácteos y otros alimentos [16]. *B. licheniformis* presenta características fisiológicas, como producir endosporas para resistir diferentes ecosistemas y la producción de sustancias antimicrobianas, como lipopéptidos, péptidos, fosfolípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos, con la finalidad de poder inhibir patógenos de alguna fuente animal, vegetal o humana [28].

B. licheniformis es una bacteria Gram positiva, es anaerobia facultativa, presenta la capacidad de crecer en un amplio rango de temperatura, que va desde 15 a 55°C. Además, se caracteriza por hidrolizar caseína, almidón, celulosa y gelatina [16]. Es de gran interés comercial debido a la cantidad de productos extracelulares que puede llegar a producir. Durante las últimas décadas, se ha utilizado para llevar a cabo la producción de enzimas industriales, incluidas algunas proteasas, α -amilasa, penicilinas, pentosanasa, cicloglucosiltransferasa, β -mananasa y varias enzimas pectinolíticas. Algunas aplicaciones industriales, incluyen la formulación de detergentes, así como el depilado del cuero. También es utilizada para la hidrólisis del almidón el desencolado de textiles y el encolado de papel [29].

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

De acuerdo con la investigación realizada por Pant y colaboradores (2015), se reportó la producción de proteasa termoestable y su caracterización a partir de *B. subtilis* para posibles aplicaciones industriales. Se utilizó gelatina como sustrato al 1% (p/v) en medio de agar nutritivo en donde se obtuvo una alta actividad proteolítica (22 mm). En condiciones de fermentación sumergida, se reportó una

alta producción de proteasa (243.28 U/mL) a 45°C después de 36 h de incubación con pH óptimo de 10 en agitación continua de 180 rpm [30].

De acuerdo con Lakshmi y colaboradores (2014), se llevó a cabo la producción de una proteasa alcalina a partir de *B. licheniformis* con el fin de utilizarla en posibles procesos industriales. La producción máxima de enzima fue de 184 ± 0.25 U/mL en donde se utilizó 1% (p/v) de caseína como sustrato. La cual, se obtuvo a las 72 h de incubación en condiciones óptimas de 65°C con un pH 10.0 a 160 rpm mediante fermentación sumergida [31].

De acuerdo con Mushtaq y colaboradores (2021), se reportó el aislamiento de *B. amyloliquefaciens* HM48 para la producción de proteasa. El análisis cualitativo reveló que formó zonas hidrolíticas prominentes (28 mm) alrededor de sus colonias en medio que contenían caseína al 1% (p/v) como sustrato. La enzima cruda mostró una alta actividad de 313.18 U/mL a pH 8.0 con una temperatura óptima de 70°C. Además, se precipitó con sulfato de amonio al 80% (215.63 U/mL). Posteriormente, se purificó mediante diálisis (160.06 U/mL) y cromatografía de filtración en gel (114.49 U/mL). El peso molecular de la enzima purificada fue de aproximadamente 25 kDa. Tales características hacen que esta proteasa termoestable sea adecuada para aplicaciones industriales ambientales de alta temperatura [32].

De acuerdo con la investigación de Tarek y colaboradores (2023), se realizó la purificación y caracterización bioquímica de una nueva proteasa alcalina (SH21) producida por *B. siamensis* con potencial detergente. La enzima mostró excelente actividad enzimática a pH 9.0 y a una temperatura de 55°C. Se determinó que el peso molecular rondaba los 25 kDa. Además, se reportó que este tipo de proteasa se inhibió por completo en presencia de PMSF y DFP, lo que indicó que era un miembro de la familia de las serina proteasas. También, se demostró una alta estabilidad a la exposición a varios detergentes comerciales, reteniendo la actividad original más alta (97%). La cual, se puede utilizar como aditivo en la formulación de detergentes para ropa [33].

En la investigación realizada por Saeed y colaboradores (2023), se produjo y purificó una metaloproteasa alcalina a partir de *B. cereus*. La proteasa se produjo mediante fermentación sumergida utilizando caseína (0.5% p/v) como sustrato. La actividad enzimática máxima (294.51 U/mL) se observó en un valor de pH 10 y una temperatura óptima de 70°C. Se purificó mediante precipitación con sulfato de amonio (201.97 U/mL) seguido de una cromatografía de intercambio iónico (111.30 U/mL). También, se reportó que el peso molecular fue de 35 kDa. Además, se encontró que la actividad se inhibía en presencia de EDTA, pero

PMSF no presenta ningún efecto, lo que sugiere que la proteasa es del tipo metaloproteasa [34].

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

En este proyecto de investigación se llevara a cabo la caracterización bioquímica de una enzima proteolítica producida por *B. licheniformis* LB05 termotolerante aislado del municipio de Mina, Nuevo León, México.

De acuerdo con la literatura, las especies del género *Bacillus* son una de las fuentes más destacadas por producir enzimas extracelulares. De forma particular, *B. licheniformis* se caracteriza por ser un microorganismo termófilo, lo que con lleva a la producción de enzimas termoestables. Las cuales, son de gran interés en el mercado, debido a que los distintos sectores industriales buscan enzimas capaces de presentar un alto rendimiento en presencia de condiciones extremas, como es el caso de temperatura, pH, resistencia a desnaturalizantes y a disolventes orgánicos. La mayoría de las proteasas que se encuentran actualmente en el mercado, se desarrollan en temperaturas que van desde los 40 a 80°C, en un rango de pH entre 10 a 12 y presentan resistencia a detergentes surfactantes [16, 35].

En la investigación realizada por Lakshmi y colaboradores (2014), se reportó la producción de una proteasa alcalina a partir de *B. licheniformis*, alcanzando una actividad máxima de 184 ± 0.25 U/mL en condiciones óptimas de 65°C en un pH de 10. Presentando características ideales para diversas aplicaciones industriales [31].

Anteriormente, en el equipo de trabajo, se ha reportado la producción de enzimas hidrolíticas, como es el caso de α -amilasa y de una proteasa a partir del mismo *B. licheniformis* que se utilizó para este proyecto de investigación [16, 36] Es por eso, que en este trabajo se busca caracterizar bioquímicamente la enzima proteolítica para conocer las condiciones adecuadas a las que la enzima produzca su mayor actividad enzimática, buena estabilidad y resistencia a diferentes tipos de surfactantes. Así como determinar su peso molecular y clasificación a la que pertenece.

CAPÍTULO 4

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

La enzima proteolítica producida por *B. licheniformis* LB05 presenta la máxima actividad enzimática en pH alcalino en una temperatura mayor a 60°C y buena estabilidad en presencia de detergentes.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente la enzima proteasa producida por *B. licheniformis* LB05.

4.2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad enzimática de *B. licheniformis* LB05 por método cuantitativo.
2. Determinar el perfil de comportamiento de la enzima a diferentes temperaturas y pH.
3. Determinar la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas y pH.
4. Determinar la resistencia de la enzima en presencia de diferentes tipos de detergentes e inhibidores de proteasas.
5. Purificar parcialmente la enzima proteolítica mediante ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel e intercambio iónico.
6. Identificar el peso molecular de la enzima proteolítica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).
7. Identificar la clasificación de la enzima proteolítica mediante la técnica electroforética zimograma utilizando diferentes tipos de inhibidores.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico, reactivos y equipos de laboratorio

5.1.1. Material biológico

Se utilizó la cepa de *B. licheniformis* LB05 perteneciente al cepario del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1.2. Reactivos

- 1, 10-Phenanthroline Sigma-Aldrich
- Ácido acético glacial (Fisher scientific)
- Ácido clorhídrico (DEQ)
- Ácido clorhídrico J.T. Baker
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Ácido tricloroacético J.T. Baker
- Acrilamida (Amresco)
- Agar nutritivo BD Bioxon
- Alcohol etílico (DEQ)
- Azul de bromofenol (Amresco)
- Azul de Coomassie R-250 Bio-Rad
- Bisacrilamida (Amresco)
- Caldo nutritivo BD Bioxon
- Carbonato de sodio J.T. Baker
- Caseína Sigma- Aldrich
- Cloruro de calcio J.T. Baker
- Cloruro de sodio J.T. Baker
- Dodecilsulfato sódico (SDS) Bio-Rad
- Extracto de levadura BD Bioxon
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) Sigma-Aldrich

- Fosfato dipotásico J.T. Baker
- Fosfato monopotásico J.T. Baker
- Glicina Sigma- Aldrich
- Grenetina
- Hidróxido de sodio J.T. Baker
- Medio LB *Difco*TM
- Nitrato de amonio
- Peptona de caseína BD Bioxon
- Sulfato de magnesio J.T. Baker
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina) (Amresco)
- Tirosina Sigma- Aldrich
- Tris Cytiva ®
- Tritón X-100 Bio-Rad

5.1.3. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis vertical
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga
- Congelador
- Espectrofotómetro UV-vis
- Estufa de cultivo
- Fuente de poder
- Incubadora
- Incubadora con agitación orbital
- Microcentrífuga
- Microscopio binocular
- Plancha de calentamiento
- Potenciómetro
- Refrigerador
- Vortex

5.2. Métodos

5.2.1. Propagación de la cepa de *B. licheniformis* LB05

La cepa bacteriana fue recolectada y aislada en un trabajo previo del grupo de investigación y se identificó como *B. licheniformis* LB05. Para llevar a cabo la activación de la cepa bacteriana, se preparó agar nutritivo y se llevó a esterilizar a 121°C, 15 psi de presión durante 15 min. Después de su solidificación en cajas de Petri estériles, se inoculó mediante el método de siembra por estría simple y se incubó a 45°C por 24 h. Una vez terminando el periodo de incubación, se conservó en refrigeración a 4°C.

5.2.2. Producción de la enzima proteolítica por fermentación sumergida

La producción de la enzima se llevó a cabo a partir de un preinóculo utilizando caldo de lisogenia (LB), cuya composición por litro fue 10 g de peptona de caseína, 5 g de cloruro de sodio y 5 g de extracto de levadura, con un pH final de 7.2 ± 0.2 . Se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 psi de presión durante 15 min. Posteriormente se inoculó tomando una asada del cultivo anteriormente realizado de *B. licheniformis* en agar nutritivo. Se incubó por 12 h a 45°C en agitación continua a 150 rpm.

Posteriormente, se preparó 250 mL de caldo de caseína, el cual, se compone de 5 g/L de caseína, 2 g/L de extracto de levadura, 0.1 g/L de fosfato monopotásico y 0.1 g/L de fosfato dipotásico, con un pH final de 8.5. Se utilizó este medio rico en proteína para optimizar la producción de enzima proteolítica. Se añadieron 12.5 mL del preinóculo realizado (1:20) al caldo de caseína previamente esterilizado a 121°C, 15 psi de presión durante 15 min. Finalmente, se llevó a incubar a 45°C en agitación orbital a 150 rpm y se tomó muestra del cultivo cada 12 h durante 120 h para determinar su crecimiento, actividad enzimática, así como proteínas totales. Además, a partir del preinóculo que se realizó anteriormente, se inoculó por estría simple en agar nutritivo y se llevó a incubar por 24 h a 45°C, con el fin de poder observar morfología macroscópica y microscópica con ayuda de la tinción de Gram.

5.2.3. Ensayo cuantitativo para determinar la actividad proteolítica

La actividad enzimática se cuantificó utilizando caseína como sustrato. La mezcla de reacción constaba de 250 µL de solución de caseína (buffer Tris-HCl 100 mM con caseína al 1% p/v a pH 8.0) y 50 µL del sobrenadante previamente obtenido, se llevó a incubar a 45°C durante 20 min. La reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético al 5% y se llevó a centrifugar a 10 000 rpm por 10 min. Por último, la

actividad enzimática se monitoreo por el cambio de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 280 nm. La actividad se determinó detectando la presencia de tirosina comparándolo con una curva estándar. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µg de tirosina perteneciente a la caseína por min.

La actividad enzimática total (U) se calculó con la fórmula que se muestra en la Tabla 1. También, se cuantifico por el método de Bradford el contenido total de proteína presente en esta investigación para calcular la actividad enzimática específica (U/mg). A partir de la actividad total y específica se calculará la actividad residual (%), utilizando la fórmula presente en la Tabla 1.

Tabla 1. Fórmulas matemáticas para determinar la actividad enzimática total (U), específica (U/mg) y residual (%) (Montes, 2020).

Formulas	
Actividad enzimática total (U)	$U = \frac{(Abs\ 280)(factor\ de\ dilución)}{(0.001)[tiempo\ de\ reacción\ (min)]}$
Actividad específica (U/mg)	$AE = \frac{Actividad\ enzimática\ (U/mL)}{Contenido\ total\ de\ proteína\ (mg/mL)}$
Actividad residual (%)	$AR = \frac{Actividad\ enzimática\ con\ tratamiento}{Actividad\ enzimática\ sin\ tratamiento} \times 100$

5.2.4. Determinación de concentración de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Se construyó una curva de calibración a diferentes concentraciones (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL) utilizando albumina sérica bovina como estándar. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas totales tomando 100 µL de muestra y se añadió 1 mL de reactivo de Bradford. Después se mezcló con ayuda de un agitador vortex y se llevó a incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por espectroscopia UV-vis a una longitud de onda de 595 nm.

5.2.5. Determinación del crecimiento microbiano

Para determinar el crecimiento que presenta *B. licheniformis*, se realizó una curva de crecimiento a partir de la fermentación sumergida, descrita en la sección 5.2.2. Se tomó muestra del cultivo de fermentación cada 12 h a lo largo de 120 h. Posteriormente, se midió la absorbancia a 600 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-vis.

5.2.6. Determinación del perfil de comportamiento de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH

Se realizó un perfil de comportamiento enzimático a diferentes temperaturas, utilizando un rango desde los 20 a 90°C en un pH 8 durante 20 min, utilizando caseína como sustrato. Para el comportamiento enzimático a diferentes pH se utilizaron diferentes soluciones amortiguadoras (5 a 13) que se observan en la Tabla 2. Se incubó a 70°C (temperatura en donde presento la máxima actividad) durante 20 min, utilizando caseína como sustrato. La reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético al 5% y se llevó a centrifugar a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante se midió a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro UV-vis para detectar la presencia de tirosina. Se calculó la actividad enzimática total (U) y la actividad residual (%) utilizando las fórmulas que se muestran en la Tabla 1. En el caso de la actividad residual (%) se comparará las actividades obtenidas en este estudio contra la primera cuantificación realizada utilizando pH y temperatura óptima de crecimiento de la bacteria.

Tabla 2. Amortiguadores utilizados para determinar el perfil de comportamiento de la enzima a diferentes pH (Montes, 2020).

Tampón de reacción con 1% de caseína	pH
Acetato de sodio 100 mM	5
	6
	7
Tris-HCl 100 mM	8
	9
	10
Glicina-NaOH 100 mM	11
	12
	13
KCl-NaOH 100 mM	13

5.2.7. Determinación de la estabilidad de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH

Para determinar la estabilidad a diferentes temperaturas y pH se utilizó la temperatura y pH a las que se obtuvo mayor actividad enzimática. Para la prueba de estabilidad a diferentes temperaturas (20 a 90°C) se utilizó pH 11 y fue incubado durante 1 h. En el caso de la estabilidad a diferentes pH (5 a 13) como se mencionó anteriormente (Tabla 2), se incubó a 70°C durante 1 h. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5% y después se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante se midió a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro UV-vis para detectar la presencia de tirosina. Se calculó la actividad enzimática total (U) y la actividad residual (%) utilizando las fórmulas que se muestran en la Tabla 1. En el caso de la actividad residual (%) se comparó las actividades obtenidas en esta prueba contra los valores obtenidos en la cuantificación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas y pH.

5.2.8. Efecto de inhibidores y surfactantes sobre la actividad de la proteasa

Para probar el efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática, se utilizaron diferentes inhibidores como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1,10- fenantrolina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM). De la misma forma, se determinó la resistencia de la actividad proteolítica en presencia de detergentes aniónicos como no iónicos utilizando diferentes concentraciones (Tabla 3). Se preparó la mezcla de reacción que se describió en la sección 5.2.3 y se utilizó caseína como sustrato al 1% (p/v). Se llevó a incubar a 70°C en pH 11 (parámetros en donde se obtuvo mayor actividad enzimática) por 1 h. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5% y después se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se midió a 280 nm en un espectrofotómetro UV-vis para detectar la presencia de tirosina. Se calculó la actividad enzimática total (U) y la actividad residual (%) utilizando las fórmulas que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 3. Detergentes utilizados para determinar la resistencia de la enzima a diferentes concentraciones (Montes, 2020).

Detergente	Concentración
SDS	0.1% (p/v)
	0.5% (p/v)
	1% (p/v)
Triton X-100	5% (p/v)
	1% (p/v)
	5% (p/v)

5.2.9. Ultrafiltración

El extracto crudo enzimático fue separado por ultrafiltración con unidades de centrifugación COBETTER de 30 y 100 kDa para concentrar el extracto crudo. La centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 4,500 rpm durante 20 y 30 min, respectivamente.

5.2.10. Cromatografía de permeación en gel e intercambio iónico

El extracto crudo previamente concentrado con unidades de centrifugación se purificó mediante filtración en gel utilizando una columna Sephacryl S-100 (1.5 cm x 20 cm) equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.5. También, se purificó por cromatografía de intercambio aniónico mediante una columna Macro-Prep DEAE (1.0 cm x 10 cm) equilibrada con el mismo tampón (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5). En ambos casos, se recolectaron fracciones de 1 mL para posteriormente determinar la actividad enzimática y concentración de proteína.

5.2.11. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Para llevar a cabo la separación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se utilizó una cámara de electroforesis vertical (*Thermo scientific*), siguiendo el método de *Laemmli* (1970). Las composiciones del gel separador y espaciador se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de los geles de poliacrilamida (Silva, 2020).

Reactivos	Gel concentrador al 12% (p/v)	Gel separador al 4% (p/v)
Acrilamida al 30%	2 mL	0.17 mL
Tris 0.5 M pH 8.8	1.3 mL	0.13 mL (pH 6.8)
H ₂ O	1.7 mL	0.68 mL
SDS al 10%	50 µL	10 µL
APS al 10%	50 µL	10 µL
TEMED	10 µL	4 µL

Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga compuesto por Tris-HCl a 60 mM, pH 6.8; 2% (p/v) SDS, 40% glicerol (v/v) y 0.01% (p/v) azul de bromofenol. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 150 V durante

aproximadamente 1 h. El amortiguador de corrida, contenía 3 g/L Tris, 14.4 g/L glicina y 1 g/L SDS ajustando con HCl a pH 8.3.

5.2.11.1. Tinción de plata

Los geles de poliacrilamida se tiñeron utilizando el método de tinción de plata. El gel se colocó en un contenedor de plástico en donde se añadieron 25 mL de una solución fijadora (Tabla 5) por 1 h en agitación constante. Después, se procedió a lavar el gel añadiendo 30 mL de etanol al 50% durante 20 min. Este proceso se realizó dos veces más. Luego, el gel se sumergió en una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 1 min y al terminar se enjuagó tres veces con agua destilada. Posteriormente, se agregó a una solución de nitrato de plata (AgNO_3) durante 20 min en agitación constante, después el gel se lavó 2 veces con agua destilada en lapsos de 20 segundos. Por último, se agregaron 25 mL de una solución reveladora (Tabla 5), la reacción se llevó a cabo durante 10 min en agitación continua. Al finalizar el tiempo indicado, la reacción se detuvo con ácido acético al 10%. La composición de las soluciones empleadas se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de soluciones químicas utilizadas en la tinción de plata (Silva, 2020).

Tinción de plata para geles de poliacrilamida			
Solución fijadora	Metanol	20 mL	50 mL
	Ácido acético	5 mL	
	H ₂ O	25 mL	
	Formaldehido	30 µL	
Solución reveladora	Na ₂ CO ₃	3.0 g	50 mL
	Formaldehido	25 µL	
	Na ₂ S ₂ O ₃	1 mL	
	H ₂ O	50 mL	
Tiosulfato de sodio	Na ₂ S ₂ O ₃	0.01 g	50 mL
	H ₂ O	50 mL	
Nitrato de plata	AgNO ₃	0.1 g	50 mL
	Formaldehido	38 µL	
	H ₂ O	50 mL	

5.2.12. Zimograma

Para comprobar la actividad de las bandas de proteínas obtenidas mediante electroforesis, se realizó el procedimiento explicado en la sección 5.2.11. En el cual, se añadió grenetina al 1% (p/v) como sustrato. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces durante 1 h con Tritón X-100 al 2.5% (v/v) para sustituir el

SDS y el tampón de separación en el gel. Luego, el gel se llevó a incubar a 40°C durante 1 h en tampón Tris-HCl a pH 9, que contenía caseína al 1% (p/v) para observar un área limpia en el sitio de las bandas proteolíticas. Posteriormente, el gel se fijó con ácido tricloroacético al 20% (p/v) durante 1 h, finalmente se realizó la tinción con azul de Coomassie, seguido de la solución para desteñir. Las concentraciones de las soluciones empleadas para llevar a cabo la tinción se explica en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición para la tinción de azul de Coomassie y solución para desteñir (Montes, 2020).

Azul de Coomassie		Solución para desteñir	
Azul de Coomassie	2.5 g	Metanol	200 mL
Metanol	450 mL	Ácido acético glacial	150 mL
Ácido acético glacial	100 mL		
Aforar a 1 L con agua destilada			

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Crecimiento de *B. licheniformis* LB05

A partir del preinóculo realizado en medio LB, se inocularon placas de Petri que contenían agar nutritivo por medio de la técnica de estría en cuadrantes, con la finalidad de poder observar las características macroscópicas y microscópicas. Después de 24 h de incubación a 45°C, macroscópicamente (Fig. 4) se observó un crecimiento con textura seca y/o dura de color blanquecino-amarillento. Además, se logró observar colonias aisladas puntiformes, con forma irregular y borde ondulado con una elevación plana. En el caso de la morfología microscópica (Fig. 5) se pudo determinar con ayuda de la tinción de Gram. Se llegó a visualizar bacilos cortos, Gram positivos. Las características anteriormente mencionadas concuerdan con lo descrito con Montes, 2020 [16].



Figura 4. Morfología macroscópica de *B. licheniformis* LB05 en agar nutritivo.



Figura 5. Morfología microscópica de *B. licheniformis* LB05. Tinción de Gram. Observado a 100x.

6.2. Curva estándar de tirosina

Se realizó una curva estándar a partir de una solución de tirosina a diferentes concentraciones (10- 100 $\mu\text{g/mL}$) y las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis (Fig. 6). Con la finalidad de calcular la concentración de tirosina libre en los ensayos cuantitativos para determinar la actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato. Lo que sucede cuando la proteasa digiere la caseína, el aminoácido tirosina se libera junto con otros aminoácidos y fragmentos peptídicos [36].

En el gráfico que se muestra en la Figura 6, se muestra que a partir de la densidad óptica de 280 nm depende la concentración de tirosina, cuando la concentración de tirosina aumenta también incrementa su absorbancia. Las mediciones espectroscópicas de proteínas se basan en la absorción UV. Los aminoácidos aromáticos absorben luz a partir de 220 nm, sin embargo, la tirosina es el único

aminoácido aromático que cuenta con una cadena ionizable, esta característica le confiere que la absorbancia se desplace a una longitud de onda mayor [16]. Por lo tanto, la absorbancia que mide a 280 nm es causada principalmente por aminoácidos aromáticos como triptófano y tirosina, ya que depende directamente del número de aminoácidos aromáticos en la proteína [37].

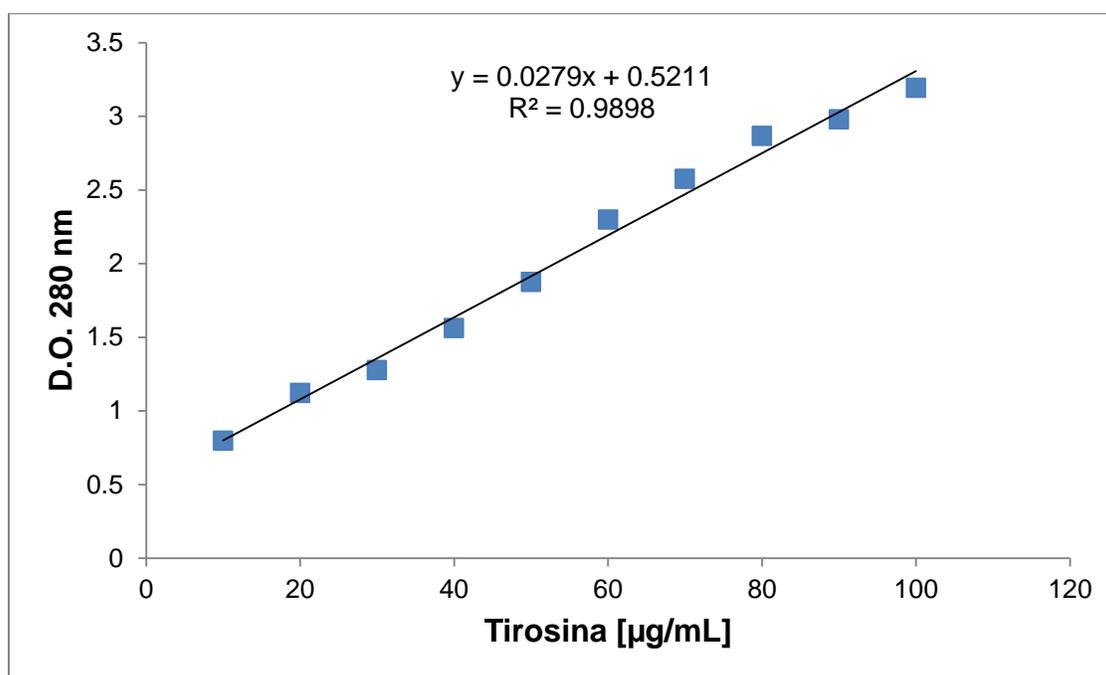


Figura 6. Curva estándar de tirosina y ecuación de la recta.

6.3. Ensayo cuantitativo para determinar la actividad proteolítica, proteína total y crecimiento bacteriano

En la Figura 7, se graficó el comportamiento de la actividad enzimática de la proteasa en la cinética de *B. licheniformis* LB05 con el contenido total de proteína. Se utilizaron las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo (45°C a pH 8.5) utilizando caseína al 1% (p/v) como sustrato. Se ha llegado a reportar que las enzimas proteolíticas alcalinas presentan mayor actividad hidrolítica contra la caseína que con otro tipo de sustratos, como albumina de suero bovino (BSA) o grenetina [38].

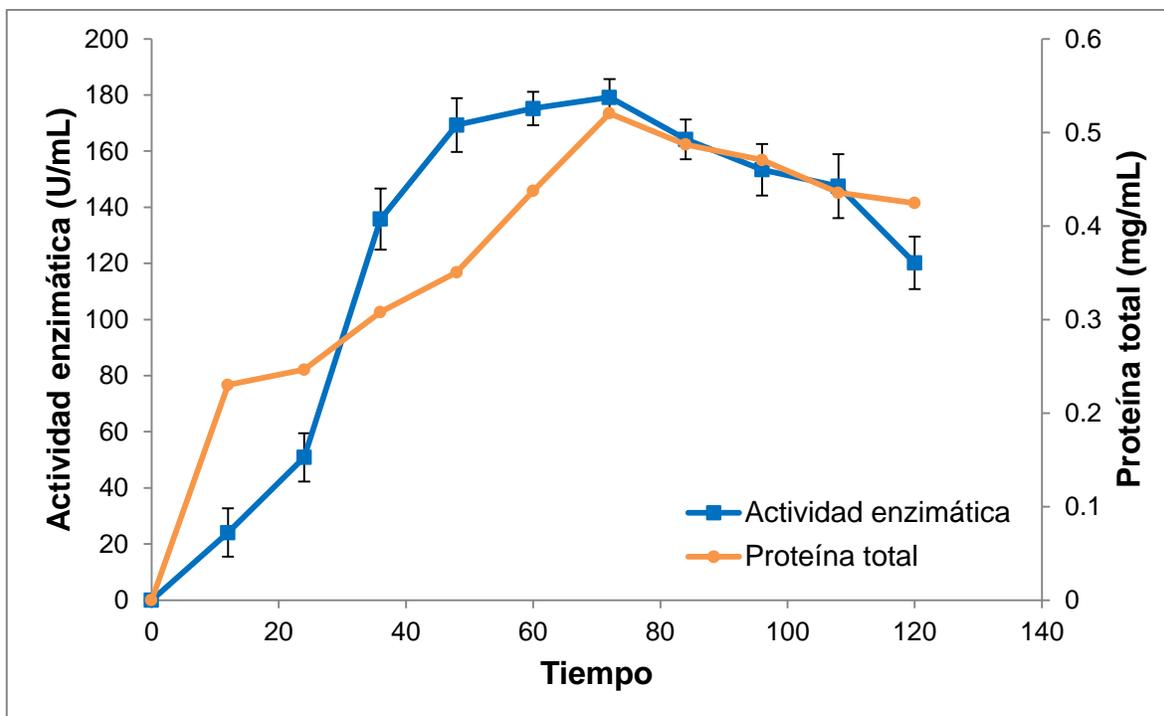


Figura 7. Relación de la concentración de proteína total y la actividad enzimática con respecto al tiempo.

El cultivo de fermentación se monitoreo cada 12 h durante las primeras 120 h de incubación, como se puede observar (Fig. 7) conforme transcurre el tiempo de incubación, la actividad enzimática y la concentración de proteína total incrementan de forma semejante, hasta alcanzar su punto máximo a las 72 h, obteniendo una actividad máxima de 179.2 U/mL y 520 mg/mL de proteína total. Posterior a la hora máxima de fermentación, la actividad enzimática y la concentración de proteínas comenzaron a descender debido al agotamiento de la fuente de carbono disponible y otros nutrientes, hasta finalizar a las 120 h de incubación con 120.2 U/mL y 424.49 mg/mL, respectivamente. Presentaron un comportamiento similar debido a que la concentración de proteínas representa el aumento en la producción de proteasa [39].

La máxima actividad obtenida de 179.2 U/mL en este proyecto de investigación es comparable con otras investigaciones realizadas anteriormente, Lakshmi y colaboradores en 2014 con 184 U/mL [31], Pant y colaboradores en 2015 con 243.28 U/mL [30], Montes en 2020 con 127.7 U/mL [16], Mushtaq y colaboradores en 2021 con 313.18 U/mL [32] y Saeed y colaboradores en 2023 con 294.51 U/mL [34]. En todos los casos, se reportó la actividad utilizando el extracto crudo enzimático a partir de diferentes especies de *Bacillus*. Se cree que estas actividades enzimáticas son ligeramente superiores a la de nosotros debido a que

ellos reportaron la máxima actividad con las condiciones óptimas de la enzima producida.

También se graficó el crecimiento bacteriano de *B. licheniformis* LB05 a una densidad óptica de 600 nm (Fig. 8) con respecto a la actividad enzimática. De la misma forma, se utilizaron las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo (45°C a pH 8.5) utilizando caseína al 1% (p/v) como sustrato. Se puede observar que el crecimiento de la bacteria es proporcional con la actividad enzimática, ya que se muestra un comportamiento similar desde que inicia la fase exponencial de la misma forma aumenta la actividad enzimática debido a que la producción de enzimas está relacionada con la fase de crecimiento del microorganismo [39]. Se alcanzó la máxima actividad enzimática (179.2 U/mL) en la fase exponencial a las 72 h de fermentación. El crecimiento celular disminuyó después de las 72 h de fermentación junto con la actividad enzimática (153.4 U/mL).

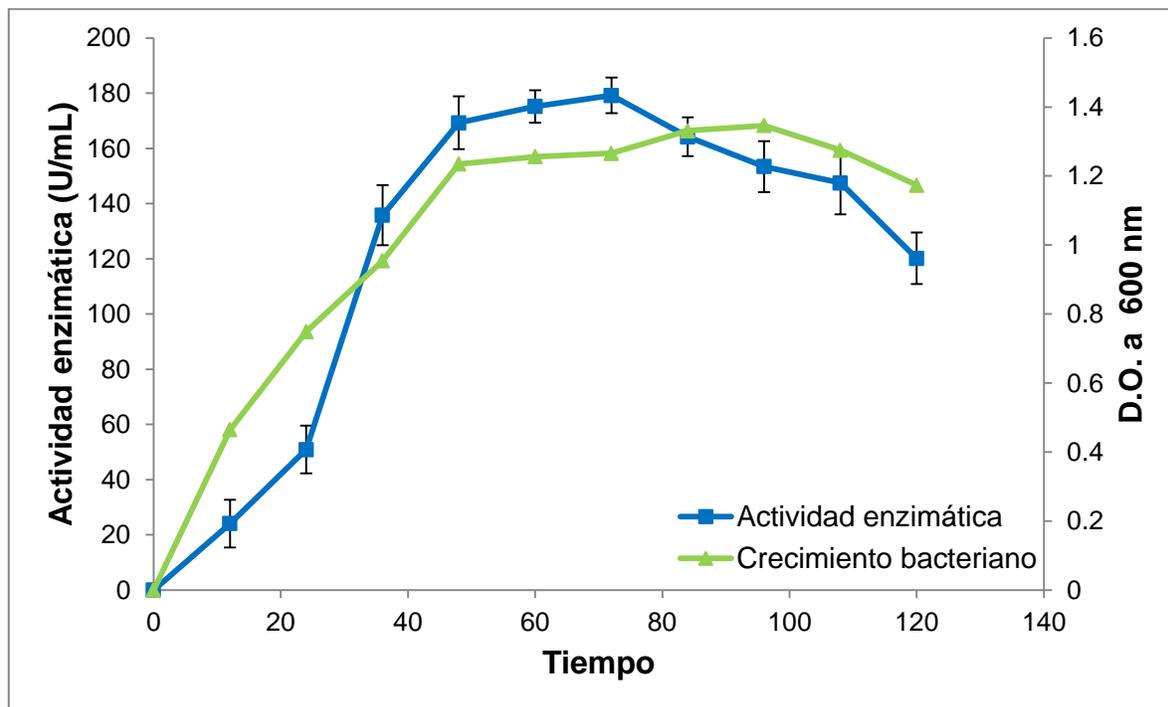


Figura 8. Relación de la actividad enzimática y el crecimiento bacteriano con respecto al tiempo

De acuerdo con Aguilar y colaboradores (2019) se ha reportado que las enzimas proteolíticas extracelulares provenientes de las especies de *Bacillus* se producen principalmente durante la fase exponencial o estacionaria del crecimiento microbiano, dependiendo la especie con la que se trabaje. En la investigación mencionada anteriormente, se reportó que la proteasa a partir de *B. licheniformis*

LBA 46 alcanzo la máxima actividad (3000 U/mL) en la fase exponencial de crecimiento después de 48 h de fermentación [39], Akkale y colaboradores en 2023, utilizaron *B. subtilis* NRRL B-3384 para producir proteasa alcalina, en donde obtuvo actividad máxima (90.8 U/mL) en la fase exponencial del crecimiento del microorganismo después de 12 h de fermentación [40], También, Asha y colaboradores en 2018, reportaron la utilización de *B. cereus* FT 1 para producir una proteasa alcalina, en donde alcanzo su actividad máxima (187 U/mL) después de 48 h de incubación al inicio de la fase estacionaria [23].

6.4. Determinación del perfil de comportamiento de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH

Primeramente, se realizó el perfil de comportamiento enzimático donde se cuantifico la actividad enzimática a diferentes temperaturas. Se utilizó un rango de 20 a 90°C en un pH 8, utilizando caseína como sustrato durante 20 min de reacción. En la Figura 9, se puede observar que la enzima presento actividad desde los 20°C (106.5 U/mL) hasta alcanzar la máxima actividad enzimática a los 70°C (256.8 U/mL). También, se logró observar que la enzima presentó actividad hasta los 90°C (129.9 U/mL). Lo cual indica que la enzima puede expresarse en un rango de temperatura muy amplio, sin embargo, la enzima proteolítica producida por *B. licheniformis* LB05 presenta una temperatura óptima de 70°C.

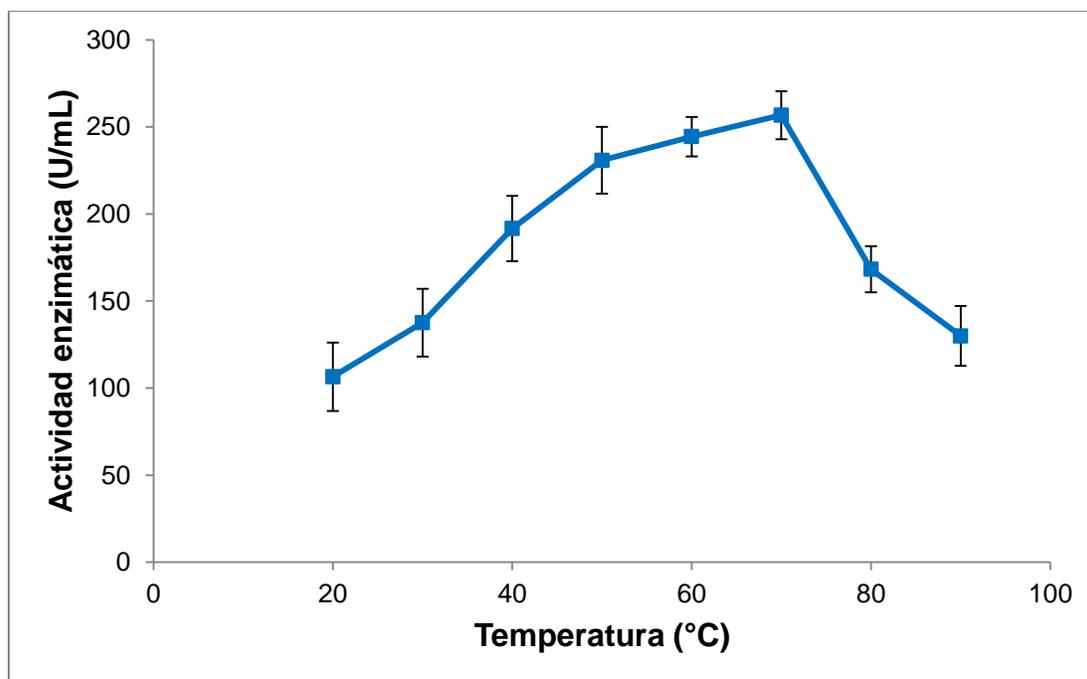


Figura 9. Perfil de comportamiento de la actividad enzimática a diferentes temperaturas (°C).

En la mayoría de las investigaciones realizadas por otros autores, se ha reportado que las especies de *Bacillus* producen enzimas proteolíticas de forma óptima cuando se encuentran en un rango de temperatura de 40 a 80°C. Kotb y colaboradores en 2023, reportaron la actividad máxima de proteasa a 55°C a partir de *Bacillus* spp [14], Thomas y colaboradores en 2020, produjeron una enzima proteolítica donde se reportó la actividad máxima a los 80°C utilizando una especie de *Bacillus* [25], Mushtaq y colaboradores en 2021, utilizaron *B. amyloliquefaciens* para producir una proteasa del tipo alcalina, la cual mostró una actividad máxima a 70°C [32] y de acuerdo con Aguilar en 2019, reportaron la producción de una proteasa alcalina a partir de *B. licheniformis* LBA 46 en donde encontraron su temperatura óptima a los 60°C [39].

En el caso del comportamiento de la actividad enzimática a diferentes pH, se utilizaron diferentes amortiguadores de un rango de 5 a 13. Se utilizó caseína como sustrato y se procedió a incubar durante 20 min a 70°C debido a que fue la temperatura en la que se registró mayor actividad en el ensayo anterior.

El motivo por el cual se probó un rango de pH mayormente alcalino es porque de acuerdo con la literatura revisada, se espera que la enzima producida en este proyecto de investigación presente un pH altamente alcalino debido a que las especies de *Bacillus* se caracterizan por producir enzimas proteolíticas alcalinas. Además, al no utilizar soluciones amortiguadoras extremadamente ácidas (menor a pH 5) es debido a que la caseína utilizada como sustrato presenta un punto isoeléctrico de 4.5 y en condiciones de pH ácidos se precipita [16].

En la Figura 10, se muestra que a partir del pH 8 existe un incremento de actividad significativo (269.1 U/mL), alcanzando su actividad máxima a pH 11 (385.6 U/mL). Por lo que se puede determinar que la enzima producida en el presente estudio a partir del extracto crudo se trate de una enzima proteolítica alcalina. De acuerdo con Kalwasińska y colaboradores (2018), mencionaron que gran parte de las enzimas que se encuentran disponibles en el mercado de enzimas industriales son proteasas alcalinas. Estas enzimas, muestran una excelente actividad y estabilidad en pH altamente alcalinos y son principalmente utilizadas para la formulación de detergentes [41].

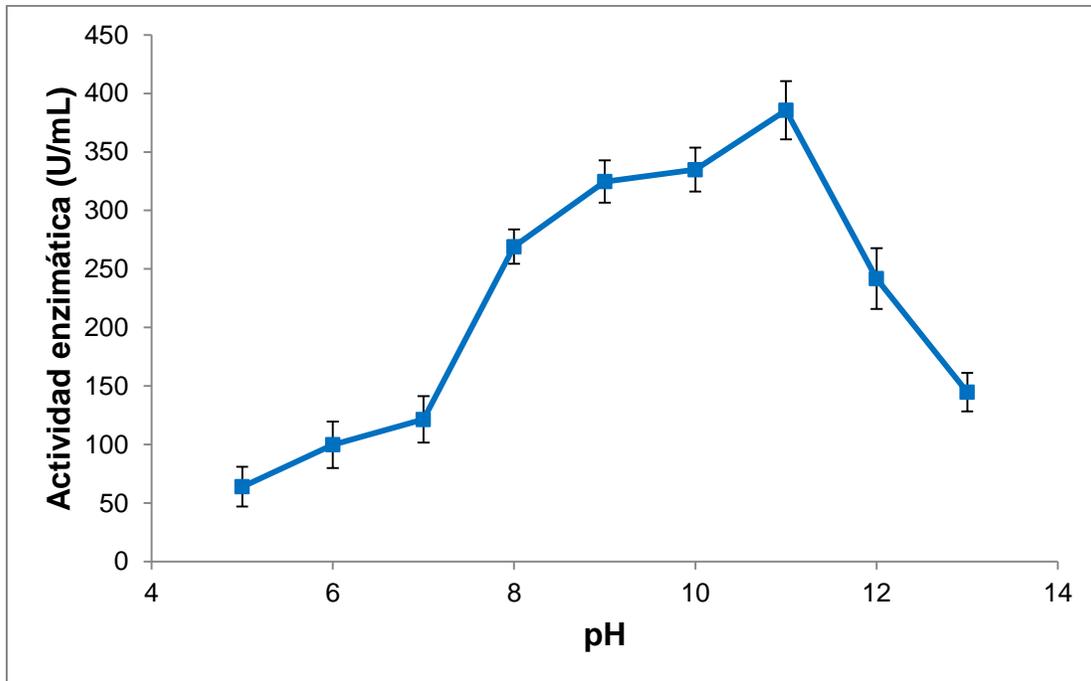


Figura 10. Perfil de comportamiento de la actividad enzimática a diferentes pH.

De la misma forma, Kotb y colaboradores (2023), reportaron que la máxima producción de proteasa fue en pH 11 a partir de *Bacillus* spp. Mar64 [14], Kalwasińska y colaboradores (2018), obtuvieron la máxima actividad de enzima proteolítica a pH de 10.5, utilizando como fuente *B. luteus* H11 [41], También, se ha reportado enzimas con pH superiores a 11. Es el caso de Mahakhan y colaboradores (2023), produjeron una proteasa alcalina a partir de *B. gibsonii* 6BS15-4 en donde se determinó que a pH 12 se reportó la mayor actividad enzimática.

6.5. Determinación de la estabilidad de la enzima proteolítica a diferentes temperaturas y pH

Como se muestra en la Figura 11, la actividad enzimática se mantuvo estable principalmente en el rango de temperatura de 30 a 70°C, la más mínima fue a los 30°C donde solamente se retuvo un 85.39% y en la actividad máxima (70°C) cerca del 97.27%. En el caso de temperaturas elevadas (80 a 90°C) se obtuvo una actividad residual del 74.43% y 73.67%, respectivamente. Lo que indica que la enzima producida por *B. licheniformis* LB05 puede ser estable en un amplio rango de temperatura, incluso elevadas.

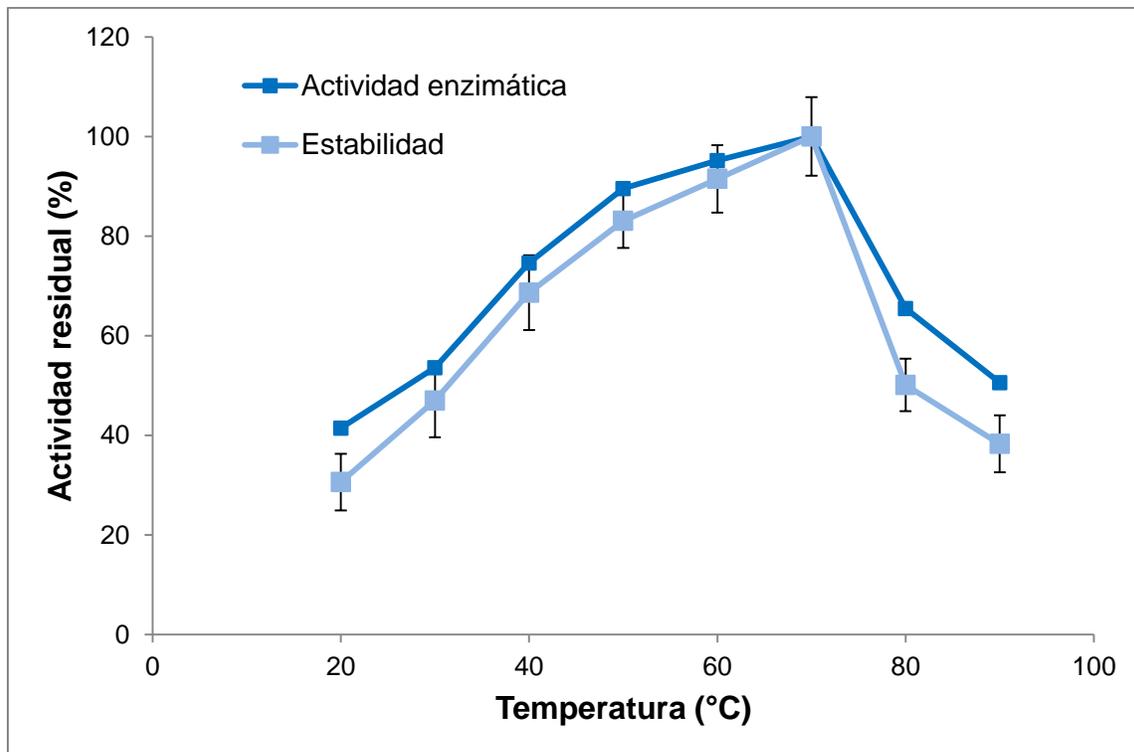


Figura 11. Relación de la actividad enzimática total y la estabilidad utilizando diferentes temperaturas (°C).

Abrar y colaboradores en 2017 mencionaron que las proteasas alcalinas son de gran interés industrial debido a sus propiedades como alta estabilidad y actividad en condiciones difíciles, como altas temperaturas y pH elevados [9]. De la misma forma, Saeed y colaboradores (2023), reportaron que la metaloproteasa alcalina a partir de *B. cereus*, mostró excelente estabilidad en un amplio rango de temperaturas y presentó actividad aún a los 90°C [34]. En el caso de Yilmaz y colaboradores (2016) determinaron que la cepa A10 de *B. licheniformis* se retuvo un 70, 84, 95 y 98% de actividad residual a las temperaturas 40, 50, 60, 70°C, respectivamente, después de 1 h de incubación [42]. También, Sellami-Kamoun y colaboradores (2008), determinaron la estabilidad térmica de una proteasa alcalina de la cepa RP1 de *B. licheniformis*, donde la enzima retuvo su mayor actividad 87.3 y 81.4% a los 50 y 55°C, respectivamente después de 60 min de incubación [43].

En la Figura 12, se puede observar que a pH 11 se retuvo la máxima actividad residual del 95.78%, solamente perdiendo aproximadamente el 6% de la actividad. Mientras que la mínima se obtuvo a pH 5, solamente reteniendo cerca del 55% de actividad. Por otra parte, se retuvo un gran porcentaje de actividad en un amplio rango de pH (7 a 12) obteniendo actividades residuales de 80.98, 89.81, 93.28, 95.78, 92.01 y 90.98%, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que

la enzima proteasa producida por *B. licheniformis* LB05, presenta una excelente estabilidad frente a pH alcalinos. De acuerdo con Karray y colaboradores (2021), reportaron la estabilidad de una nueva proteasa termoestable de *B. stearothermophilus*, en donde la enzima retuvo hasta un 89 y 82% en pH 6 y 12, respectivamente [44]. También, en el estudio realizado por Mahakhan y colaboradores (2023) se produjo una proteasa alcalina a partir de *B. gibsonii* 6BS15-4 en donde los resultados mostraron estabilidad del 100% a pH 12 durante 60 min de incubación [45].

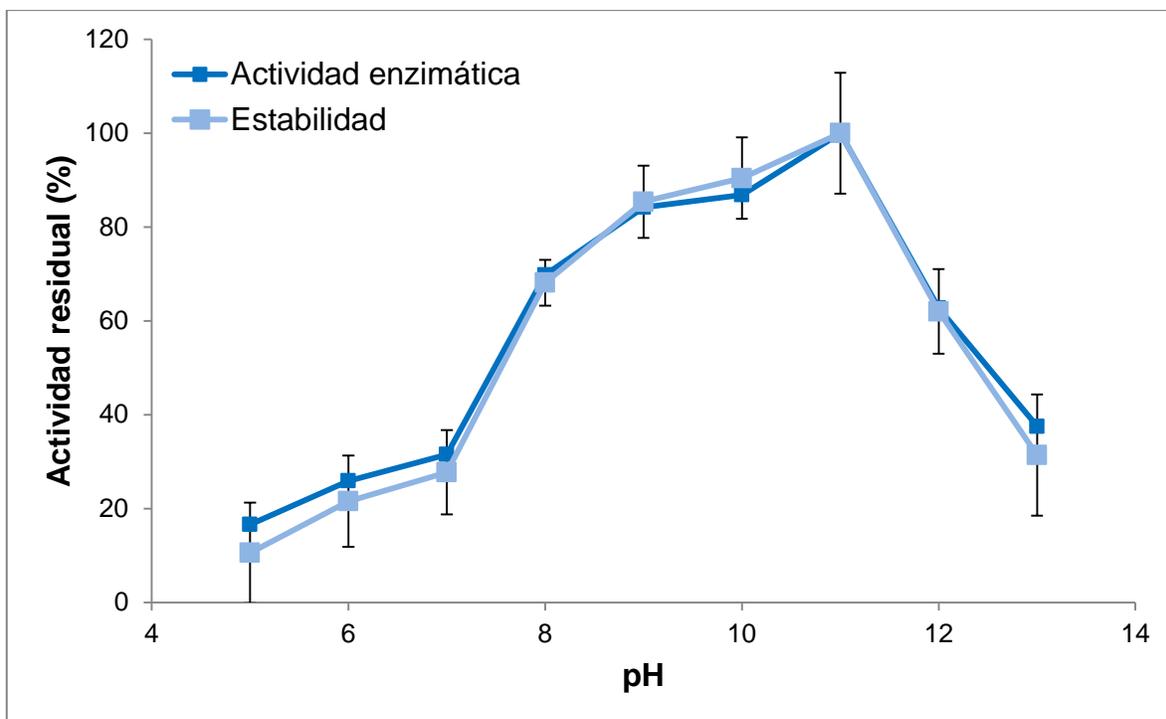


Figura 12. Relación de la actividad enzimática total y la estabilidad utilizando diferentes pH.

6.6. Efecto de inhibidores y surfactantes sobre la actividad proteolítica

Como se muestra en la Tabla 7, ninguno de los dos detergentes utilizados logró inhibir por completo la actividad enzimática. En los dos casos, se utilizó como control un ensayo que no presentaba concentración de algún detergente, lo cual se tomó como la máxima actividad residual (100%). En el caso del SDS, la enzima mostró estabilidad ante el surfactante aniónico, conforme iba aumentando la concentración, disminuía ligeramente la actividad residual reteniendo gran parte de ella durante 1 h de incubación. Sin embargo, al utilizar una concentración máxima del 5% (p/v) incremento su actividad, reteniendo hasta un 70.72% durante 1 h de incubación.

De acuerdo con Bender y colaboradores (2020) este tipo de surfactante aniónico presenta la capacidad de desnaturalizar las proteínas a una elevada concentración debido a que se encarga de alterar los enlaces no covalentes que proporcionan la estructura secundaria de la proteína [46]. Sin embargo, se cree que el incremento que hubo al utilizar una concentración del 5% es debido a que el SDS es capaz de unirse a la enzima causando cambios conformacionales en la superficie sin cambiarla internamente, lo que facilita la unión del sustrato con el sitio activo [16]. De acuerdo con Doddapaneni y colaboradores (2019) mencionan que presentar estabilidad frente al SDS es de suma importancia, ya que estas enzimas generalmente no están disponibles en el mercado, solamente algunas especies de *Bacillus*, como *B. clausii*, principalmente utilizadas en la formulación de detergentes [47].

En el caso de Tritón X-100, la enzima fue muy estable en presencia del detergente, mostrando aumentos del casi el doble de la actividad proteolítica. Entre más concentración se añadía, mayor era su actividad, incrementando hasta un 67.09% en la actividad enzimática con una concentración del 5% (p/v) durante 1 h de incubación. De acuerdo con Bender y colaboradores (2020), los surfactantes no iónicos solubilizan las proteínas en lugar de desnaturalizarlas por completo, por lo que la actividad enzimática puede conservarse en presencia de incluso altas concentraciones de surfactantes [46].

De acuerdo con estudios realizados anteriormente, la influencia de los tensioactivos sobre la actividad proteolítica es extremadamente variable. Cui y colaboradores (2015), reportaron la producción de proteasa alcalina a partir de una cepa de bacteria marina SD11, presento una excelente estabilidad en presencia de SDS al 5 mM (138%) [48], Joo y colaboradores (2003), produjeron una proteasa a partir de *B. clausii* I-52, presento estabilidad ante tensioactivos aniónicos (SDS) como no iónicos (Tritón X-100), logrando retener hasta un 73% e incrementando un 19%, respectivamente [49]. También, Tarek y colaboradores (2023) a partir de la cepa SH21 de *B. siamensis*, la enzima mostro estabilidad con la adición de tensioactivos, como el caso de SDS (85%) y Tritón X-100 (92%) en concentraciones del 1% [33]. Es de gran importancia que las diferentes tipos de enzimas proteolíticas producidas presenten resistencia y retengan la mayor parte de su actividad enzimática en presencia de surfactantes aniónicos como no iónicos, ya que estas características las hace ideales para ser utilizadas como aditivos en la formulación de detergentes y ser explotadas comercialmente.

Por otra parte, también se probó la actividad proteolítica en presencia de distintos inhibidores para determinar el grupo funcional que se encuentre en el sitio catalítico. Se utilizó un amplio rango de concentraciones (0, 5, 10, 15, 20, 25 mM) de EDTA y 1, 10- fenantrolina para identificar principalmente metaloproteasas y

PMSF para serina proteasa [5]. Como se observa en la Tabla 7, en presencia de EDTA, en donde se utilizó menor concentración (5- 10 mM) se observó mayor inhibición, alcanzando a retener el 36.45% y 35.65, respectivamente. En el caso de 1, 10- fenantrolina, no se llegó a presentar algún efecto inhibitorio, ya que se observó un incremento de actividad conforme aumentaba la concentración, incrementando hasta un 140% en su actividad residual. De acuerdo con Granados (2009), menciona que aunque el EDTA es un agente quelante de metales, tiene una mayor afinidad por el ión de calcio (Ca^{2+}) y 1,10- fenantrolina por el zinc (Zn^{2+}) [50]. De acuerdo con la literatura y los resultados obtenidos, se puede inferir que la enzima estudiada es una metaloproteasa, ya que al eliminar estos iones metálicos divalentes como Ca^{2+} , desactiva las metaloproteasas dependientes de ellos, de esta forma perdiendo su estructura y estabilidad. Mientras que el aumento de la actividad enzimática al utilizar 1,10- fenantrolina se deba a que en ciertos casos puede actuar estabilizando la estructura de la enzima o afectando favorablemente la configuración del sitio activo [51].

Por último, se probó la actividad enzimática en presencia de PMSF, en donde se observó un incremento de inhibición conforme se aumenta la concentración, llegando a retener únicamente cerca del 45% (25 mM). Lo que indica que posiblemente también se encuentre una enzima serina proteasa en el extracto estudiado. De acuerdo con Nichols y colaboradores (2020), mencionan en su investigación que PMSF inhibe las serina proteasas mediante la sulfonilación de un residuo de serina dentro del sitio activo de la enzima [52].

En conclusión, se puede inferir que en este proyecto de investigación se trate de diferentes enzimas proteolíticas, ya que perdió gran parte de su actividad al utilizar EDTA (metaloproteasa) y PMSF (serina proteasa) como inhibidores de proteasas.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados anteriormente. Como el estudio de Tarek y colaboradores en 2023, donde PMSF inhibió la proteasa producida por *B. siamensis* [33]. Así como la proteasa alcalina de Sellami-Kamoun y colaboradores en 2006, producida por *B. licheniformis* RP1 [43].

Tabla 7. Efecto de distintos detergentes e inhibidores de enzimas proteolíticas sobre la actividad enzimática.

Detergentes/ Inhibidores	Concentración	Actividad residual (%)
	0	100
SDS	0.1% (p/v)	94.02
	0.5% (p/v)	73.75
	1% (p/v)	57.78
	5% (p/v)	70.72
Triton X-100	1% (p/v)	122.17
	5% (p/v)	167.09

	5 mM	36.45
	10 mM	35.65
EDTA	15 mM	52.23
	20 mM	80.69
	25 mM	76.99
	5 mM	227.49
	10 mM	236.6
1,10- fenantrolina	15 mM	238.89
	20 mM	239.72
	25 mM	240
	5 mM	76.66
	10 mM	71.94
PMSF	15 mM	46.31
	20 mM	47.26
	25 mM	45.97

Para corroborar los resultados obtenidos de forma cualitativa se realizó un zimograma, en la Figura 13, se observó bandas de actividad enzimática a partir del extracto crudo de *B. licheniformis* LB05. Se mostraron zonas claras de hidrólisis de gnetina al 1% (p/v), lo que demostró la presencia de actividad proteolítica. Además, se probó en presencia de inhibidores de proteasas en diferentes concentraciones de acuerdo con lo mencionado en la literatura, EDTA (5 mM), 1,10- fenantrolina (20 mM) y PMSF (5 mM). En la Figura 13, se puede observar en el carril 1 a la enzima proteolítica comercial como referencia, en el carril 2 y 3 al extracto crudo obtenido a las 48 y 72 h de fermentación, respectivamente. Por último, en los carriles 4, 5 y 6 se colocó el extracto crudo (72 h) con los inhibidores anteriormente mencionados. Como se puede visualizar, se presentó una notoria inhibición únicamente en el carril 6, lo que demuestra que la enzima de este proyecto de investigación principalmente se trate de una serina proteasa. De acuerdo con Sharma y colaboradores (2019), mencionan en su estudio que la mayoría de las proteasas alcalinas son completamente inhibidos por PMSF [5]. El compuesto se une específicamente a la serina del sitio activo de la proteasa de esta forma inactiva completamente la actividad enzimática [38].

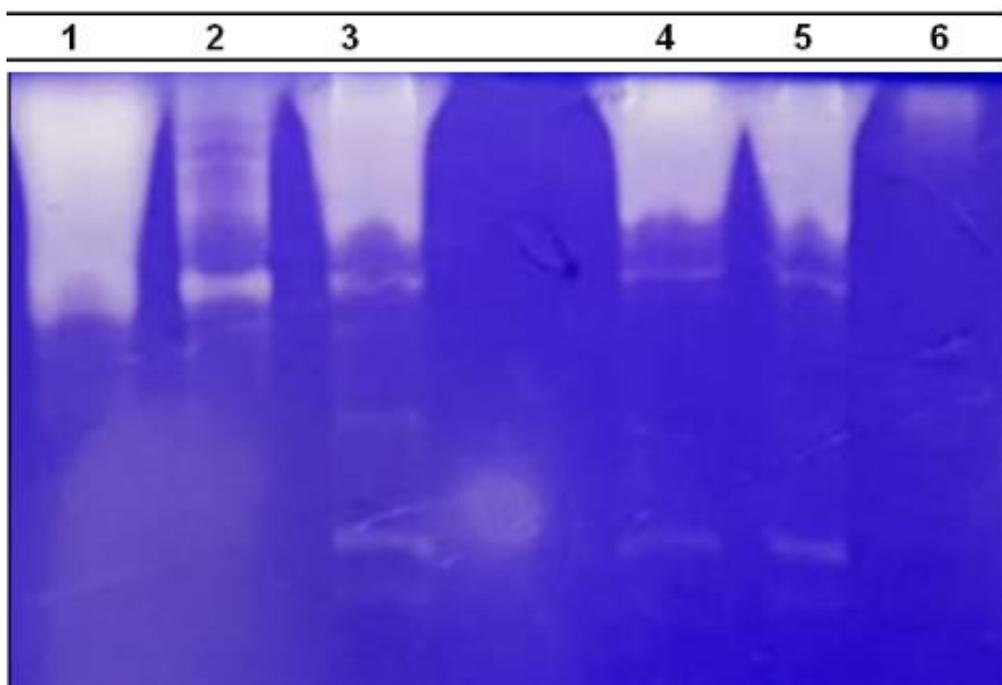


Figura 13. Zimografía de una enzima proteolítica de la cepa LB05 de *B. licheniformis*. **1.** Enzima proteolítica comercial de *B. licheniformis*. **2.** Extracto crudo (48 h). **3.** Extracto crudo (72 h). **4.** Extracto crudo con EDTA (5 mM). **5.** Extracto crudo con 1,10- fenantrolina (20 mM). **6.** Extracto crudo con PMSF (5mM).

6.7. Concentración de proteasa por ultrafiltración

Tras realizar la producción de proteasa por fermentación líquida, se procedió a concentrar por ultrafiltración en la cual se utilizaron filtros con poros de 30 y 100 kDa, ya que la enzima estudiada presenta un peso molecular que oscila entre 30 y 70 kDa. Como se observa en la Tabla 8, se logró elevar la actividad enzimática inicial a partir del extracto crudo (174 U/mL), logrando incrementar un poco más de la mitad (312 U/mL) con el extracto retenido a 30 kDa, obteniendo una actividad específica de 589 U/mg.

Tabla 8. Comparación de la actividad enzimática (U/mL), proteína total (mg/mL) y actividad específica (U/mg) mediante ultrafiltración.

	Actividad enzimática (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	174	0.36	476
Ultrafiltración (100 kDa)	161	0.29	557

Ultrafiltración (30 kDa)	312	0.53	589
-------------------------------------	-----	------	-----

6.8. SDS- PAGE y Zimograma

Se utilizó un gel de electroforesis SDS-PAGE para determinar el peso molecular de la proteasa de *B. licheniformis* LB05, mostró un peso aproximadamente de 66 kDa (Fig. 14). Además, se comparó el extracto crudo (Carril 2), así como los extractos obtenidos por medio de ultrafiltración de 30 y 100 kDa (Carril 3- 4) con una muestra de proteasa comercial de Sigma Aldrich. También, se realizó el análisis del zimograma en donde se reveló una banda de actividad proteolítica, debido a la hidrolisis de la grenetina, lo cual corresponde a la banda obtenida de la misma forma en SDS-PAGE. De acuerdo con Naveed y colaboradores (2021), mencionan en su investigación que las proteasas presentan un peso molecular de 18 a 90 kDa [2]. Sin embargo, nuestra enzima presenta un mayor peso molecular con lo reportado con Aguilar (2019), en donde a partir de *B. licheniformis* LBA 46 se estimó en 40 kDa mediante SDS-PAGE [39]. Saeed y colaboradores (2023), reportó su metaloproteasa alcalina a partir de *B. cereus* TS2 con un peso molecular de 35 kDa [34]. Kalwasinska y colaboradores (2018), mencionan que su enzima producida a partir de *B. luteus* H11 presentó un peso alrededor de 37 kDa [41]. También, Kotb y colaboradores (2023), a partir de una especie de *Bacillus* se obtuvo un peso de 28 kDa [14].

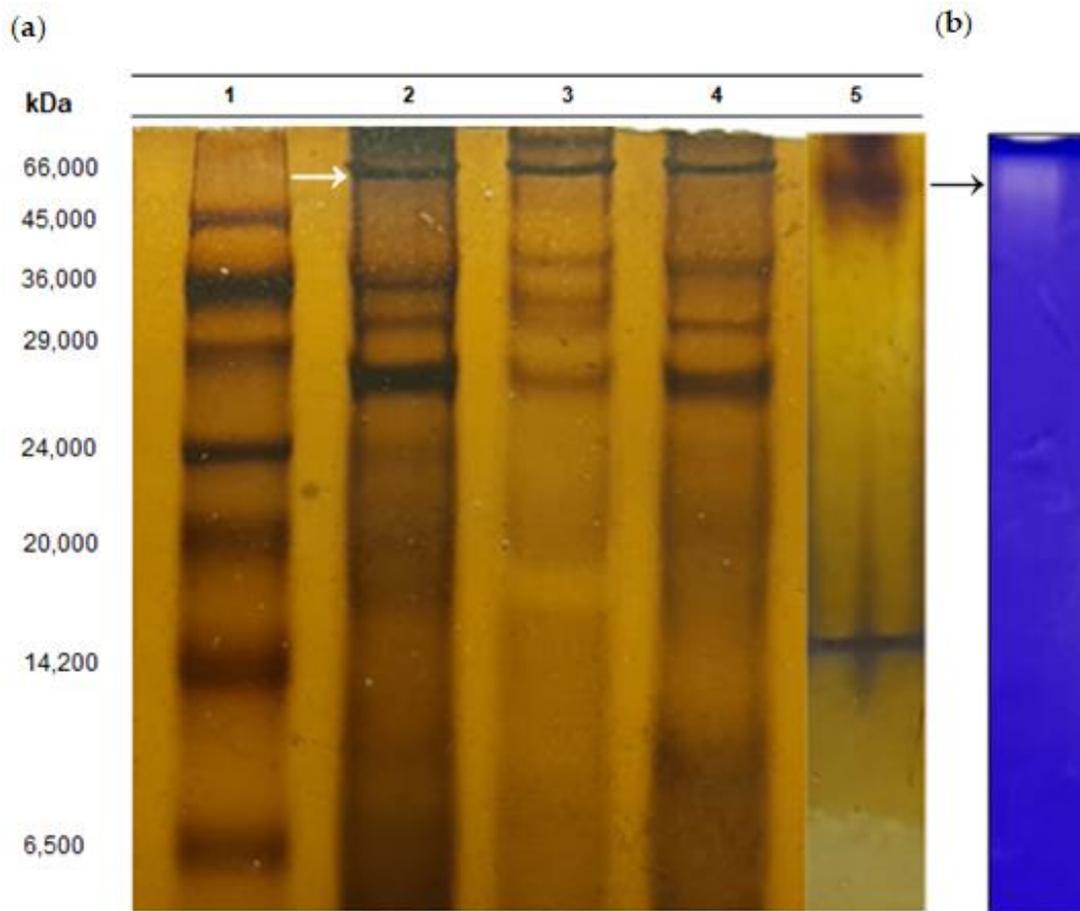


Figura 14. (a) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%). 1. Marcador de peso molecular (66,000-6,500 kDa). 2. Extracto crudo (72 h). 3. Extracto filtrado (100 kDa). 4. Extracto retenido (30 kDa). 5. Enzima proteolítica comercial (*B. licheniformis*). (b) Zimograma de extracto retenido (30 kDa).

6.9. Cromatografía de permeación de gel e intercambio iónico

A partir de la concentración mediante ultrafiltración, se procedió a purificar la enzima mediante cromatografía de filtración de gel e intercambio iónico. Se utilizó el extracto enzimático obtenido a 30 kDa, ya que es el extracto que presentó mayor actividad enzimática, así como específica. En la cromatografía de permeación en gel (Sephacryl S-100) se obtuvieron un total de 111 fracciones (1 mL), de las cuales presento actividad proteolítica únicamente en 6 de ellas (14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20). Como se observa en la Figura 15, se identificó de forma cualitativa las fracciones que presentaron actividad proteolítica mediante halos de hidrólisis de caseína, proteínas presentes en la leche [53]. Obteniendo actividades enzimáticas significativas de 20.4 U/mL (F- 14), 16.5 U/mL (F- 16) y 26.4 U/mL (F- 17). Mientras que en las demás fracciones no se logró detectar actividad

proteolítica. De acuerdo con Mushtaq y colaboradores en 2021, obtuvieron una actividad enzimática de 114.49 U/mL después de purificar mediante exclusión por tamaño [32]. De la misma forma, se purificó el extracto obtenido (30 kDa) por cromatografía de intercambio iónico (Macro-Prep DEAE). Se obtuvieron un total de 35 fracciones de 1 mL cada una, presentando actividad proteolítica únicamente en 5 de ellas (4, 5, 6, 8 y 9) como se muestra en la Figura 15. Se obtuvieron actividades significativas de la fracción 4 (37.5 U/mL), fracción 5 (41.2 U/mL) y fracción 6 (32.5 U/mL). De acuerdo con Yildirim y colaboradores en 2017, obtuvieron 76.3 U/mL después de realizar una purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico [1]. También, Aguilar y colaboradores en 2019, obtuvieron una actividad de 327.90 U/mL utilizando una columna DEAE-Sephrose [39]. Los resultados revisados en la literatura, presentaron una actividad enzimática superior a los obtenidos en este proyecto de investigación, debido a que en la literatura previamente se realizó una precipitación con sulfato de amonio antes de purificar mediante cromatografía en columna.

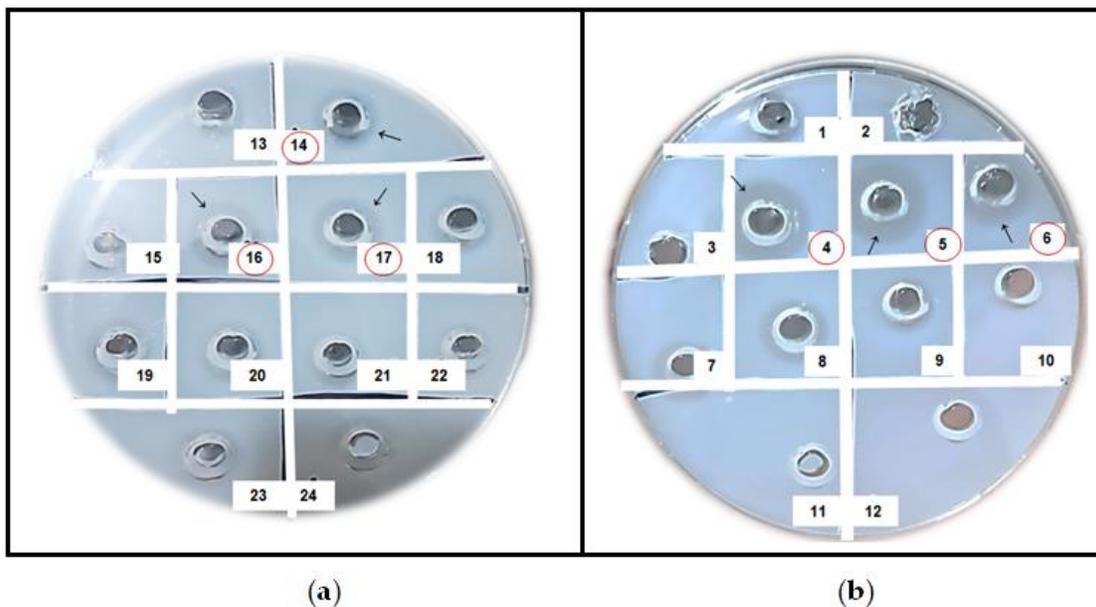


Figura 15. (a) Fracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel y por (b) cromatografía de intercambio iónico. Agar bacteriológico al 10% con leche descremada.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

A partir del extracto crudo se confirmó la capacidad de hidrolizar caseína y grenetina mediante la determinación de la actividad enzimática por método cuantitativo debido a la presencia de una enzima proteolítica. Se obtuvo una actividad enzimática total de 179.2 U/mL en condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria (45°C a pH 8.5) a las 72 h de incubación mediante fermentación sumergida en un medio rico de proteína (caseína) con agitación orbital de 150 rpm.

La enzima mostró actividad enzimática en un amplio rango de temperaturas (20 a 90°C), donde la actividad máxima se reportó a los 70°C (256.8 U/mL) en pH 8. Mientras que el comportamiento a diferentes pH (5 a 13), se obtuvo una actividad máxima a pH 11.0 (385.6 U/mL) a 70°C. En el caso de los ensayos de estabilidad, la temperatura mantuvo una actividad superior al 80% en un rango de temperatura de 30 a 70°C en pH 11. Lo que indica que la enzima producida por *B. licheniformis* LB05 puede ser estable en un amplio rango de temperatura, incluso elevadas. De la misma forma, retuvo la actividad aproximadamente el 80% en un rango de pH 7 a 12 a 70°C.

La actividad enzimática se probó en presencia de surfactantes aniónicos (SDS) como no iónicos (Tritón X-100), obteniendo como resultado una excelente estabilidad, ya que no logró inhibir más del 50% de su actividad proteolítica. También, se probó ante diferentes inhibidores de proteasas, donde mostro inhibición por parte de EDTA y PMSF. Por lo tanto, se puede inferir que en el extracto crudo estudiado, se encuentren proteasas del tipo metaloproteasas como serina proteasa. Estos resultados se corroboraron mediante un gel de zimograma, en donde solamente se observó inhibición ante PMSF.

El extracto crudo enzimático, se concentró por ultrafiltración (30 kDa) llegando a obtener una actividad enzimática de 312 U/mL, proteína extracelular de 0.53 mg/mL y actividad específica 589 U/mg. Se determinó el peso molecular mediante un gel de electroforesis (SDS-PAGE) mostrando un peso aproximadamente de 66 kDa.

Por último, se realizó una purificación por medio de cromatografía de filtración de gel e intercambio iónico en donde sus mayores actividades enzimáticas fueron de 26.4 y 41.2 U/mL, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que la proteasa producida por la cepa LB05 de *B. licheniformis* es una enzima proteolítica alcalina que pertenece principalmente al grupo de serina proteasas. Lo cual, la hace óptima para utilizarla en diferentes procesos industriales como en la formulación de detergentes, ya que presenta estabilidad en un rango de pH alcalino, también resiste altas temperaturas y a surfactantes aniónicos como no iónicos.

7.1. Recomendaciones y perspectivas

Se recomienda añadir una etapa más de purificación, realizando una diálisis por precipitación con sulfato de amonio y repetir las cromatografías en columna de exclusión por tamaño e intercambio iónico para mejorar la purificación de la enzima, ya que por sus propiedades pudiera presentar una amplia aplicación en diversos campos industriales y pueda producirse a gran escala a partir del microorganismos *B. licheniformis* LB05 mediante fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. Yildirim, M. O. Baltaci, I. Ozgencli, M. Sisecioglu, A. Adiguzel, and G. Adiguzel, "Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 468–477, 2017.
- [2] M. Naveed, F. Nadeem, T. Mehmood, M. Bilal, Z. Anwar, and F. Amjad, "Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review," *Catal. Letters*, vol. 151, no. 2, pp. 307–323, 2021.
- [3] V. H. S. Bezerra, S. L. Cardoso, Y. Fonseca-Bazzo, D. Silveira, P. O. Magalhães, and P. M. Souza, "Protease produced by endophytic fungi: A systematic review," *Molecules*, vol. 26, no. 22, 2021.
- [4] P. Solanki, C. Putatunda, A. Kumar, R. Bhatia, and A. Walia, "Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses," *3 Biotech*, vol. 11, no. 10, pp. 1–25, 2021.
- [5] M. Sharma, Y. Gat, S. Arya, V. Kumar, A. Panghal, and A. Kumar, "A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches," *Ind. Biotechnol.*, vol. 15, no. 2, pp. 69–78, 2019.
- [6] R. B. Mala, T. M. Aparna, G. S. Mohini, and D. V. Vasantim, "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 3, pp. 597–635, 1998.
- [7] A. Razzaq *et al.*, "Microbial proteases applications," *Front. Bioeng.*

- Biotechnol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–20, 2019.
- [8] P. Song *et al.*, “Microbial proteases and their applications,” *Front. Microbiol.*, vol. 14, no. September, pp. 1–24, 2023.
- [9] T. Abrar and T. A. Hamza, “Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use Sugar Cane Production Via Tissue Culture Methods View project Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use,” *Int. J. Chem. Biomol. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [10] N. C. Gimenes, E. Silveira, and E. B. Tambourgi, “An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications,” *Sep. Purif. Rev.*, vol. 50, no. 3, pp. 223–243, 2021.
- [11] F. J. Contesini, R. R. de Melo, and H. H. Sato, “An overview of Bacillus proteases: from production to application,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 38, no. 3, pp. 321–334, 2018.
- [12] K. M. Sharma, R. Kumar, S. Panwar, and A. Kumar, “Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 115–126, 2017.
- [13] E. Shukla, A. D. Bendre, and S. M. Gaikwad, “Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes,” 2022.
- [14] E. Kotb *et al.*, “Isolation, Screening, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria and Application of the Most Potent Enzyme from Bacillus sp. Mar64,” *Fermentation*, vol. 9, no. 7, 2023.
- [15] J. Mótyán, F. Tóth, and J. Tózsér, “Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology,” *Biomolecules*, vol. 3, no. 4, pp. 923–942, 2013.
- [16] Q. F. B. Laura, I. M. Vázquez, C. Orientación, M. E. Aplicada, and A. Blanco Gámez, “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEASA PRODUCIDA POR Bacillus licheniformis LB04,” 2018.
- [17] C. Zhou, H. Qin, X. Chen, Y. Zhang, Y. Xue, and Y. Ma, “A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–18, 2018.
- [18] N. Trehan, S. Kaur, F. Sahib, and F. Sahib, “ISSN : 2321-8614 (Print) ISSN : 2454-2318 (Online),” vol. 7, no. June, pp. 50–57, 2019.
- [19] F. David Troncoso, D. Alberto Sánchez, and M. Luján Ferreira, “Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review,” *ChemistryOpen*, vol. 11, no. 3, 2022.

- [20] M. Aider, "Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates," *JDS Commun.*, vol. 2, no. 5, pp. 233–237, 2021.
- [21] P. M. de Souza *et al.*, "A biotechnology perspective of fungal proteases," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 337–346, 2015.
- [22] M. Naeem *et al.*, "Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review," *J. Fungi*, vol. 8, no. 2, pp. 1–32, 2022.
- [23] B. Asha and M. Palaniswamy, "Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 119–127, 2018.
- [24] I. Danilova and M. Sharipova, "The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production," *Front. Microbiol.*, vol. 11, no. August, 2020.
- [25] N. N. Thomas, V. Archana, S. Shibina, and B. T. Edwin, "Isolation and characterization of a protease from *Bacillus* sps," *Mater. Today Proc.*, vol. 41, no. xxxx, pp. 685–691, 2020.
- [26] M. F. Villarreal-Delgado, E. D. Villa-Rodríguez, L. A. Cira-Chávez, M. I. Estrada-Alvarado, F. I. Parra-Cota, and S. De los Santos-Villalobos, "El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola," *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 95–130, 2018.
- [27] B. Journal, "The genetic diversity of genus," pp. 309–324, 2012.
- [28] Z. L. Ji, S. Peng, L. L. Chen, Y. Liu, C. Yan, and F. Zhu, "Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 145, pp. 594–603, 2020.
- [29] M. W. Rey *et al.*, "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species.," *Genome Biol.*, vol. 5, no. 10, 2004.
- [30] G. Pant *et al.*, "Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 50–55, 2015.
- [31] B. K. M. Lakshmi, P. V. R. Sri, K. A. Devi, and K. P. J. Hemalatha, "Original Research Article Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of Alkaline protease," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 650–659, 2014.
- [32] H. Mushtaq, A. Jehangir, S. A. Ganai, S. Farooq, B. A. Ganai, and R. Nazir, "Biochemical characterization and functional analysis of heat stable high

potential protease of bacillus amyloliquefaciens strain HM48 from soils of Dachigam national park in Kashmir Himalaya,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 1, pp. 1–26, 2021.

- [33] H. Tarek, K. Bin Nam, Y. K. Kim, S. A. Suchi, and J. C. Yoo, “Biochemical Characterization and Application of a Detergent Stable, Antimicrobial and Antibiofilm Potential Protease from Bacillus siamensis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 6, 2023.
- [34] K. Saeed *et al.*, “Characterization of alkaline metalloprotease isolated from halophilic bacterium Bacillus cereus and its applications in various industrial processes,” *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 95, no. 3, pp. 1–14, 2023.
- [35] A. Silva-Salinas, M. Rodríguez-Delgado, J. Gómez-Treviño, U. López-Chuken, C. Olvera-Carranza, and E. A. Blanco-Gámez, “Novel Thermotolerant Amylase from Bacillus licheniformis,” *Microorganisms*, pp. 1–14, 2021.
- [36] F. Benimana, I. Y. Potoroko, D. U. Bagale, M. Olivier, and K. Felicien, “Protease activity in flesh leaves of bidens pilosa,” *Int. J. Sci. Technol. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 3108–3112, 2020.
- [37] K. Reinmuth-Selzle *et al.*, “Determination of the protein content of complex samples by aromatic amino acid analysis, liquid chromatography-UV absorbance, and colorimetry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 414, no. 15, pp. 4457–4470, 2022.
- [38] J. Bezawada, S. Yan, R. P. John, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli, “Recovery of Bacillus licheniformis Alkaline Protease from Supernatant of Fermented Wastewater Sludge Using Ultrafiltration and Its Characterization,” *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2011, pp. 1–11, 2011.
- [39] dos J. G. S. Aguilár, R. J. S. de Castro, and H. H. Sato, “ALKALINE PROTEASE PRODUCTION by Bacillus licheniformis LBA 46 in A BENCH REACTOR: Effect of temperature and agitation,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 615–625, 2019.
- [40] C. AKKALE, “Production, Optimization and Partial Characterization of Alkaline Protease from Bacillus subtilis spp. subtilis NRRL B-3384 and B-3387,” *Hittite J. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 2, pp. 135–144, 2023.
- [41] A. Kalwasińska, U. Jankiewicz, T. Felföldi, A. Burkowska-But, and M. S. Brzezinska, “Alkaline and halophilic protease production by Bacillus luteus H11 and its potential industrial applications,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 56, no. 4, pp. 553–561, 2018.
- [42] B. Yilmaz, M. O. Baltaci, M. Sisecioglu, and A. Adiguzel, “Thermotolerant alkaline protease enzyme from Bacillus licheniformis A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents,” *J. Enzyme*

Inhib. Med. Chem., vol. 31, no. 6, pp. 1241–1247, 2016.

- [43] A. Sellami-Kamoun, A. Haddar, N. E. H. Ali, B. Ghorbel-Frikha, S. Kanoun, and M. Nasri, “Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations,” *Microbiol. Res.*, vol. 163, no. 3, pp. 299–306, 2008.
- [44] A. Karray, M. Alonazi, H. Horchani, and A. Ben Bacha, “A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothermophilus* isolated from olive oil mill sals suitable to industrial biotechnology,” *Molecules*, vol. 26, no. 4, 2021.
- [45] P. Mahakhan *et al.*, “Alkaline Protease Production from *Bacillus gibsonii* 6BS15-4 Using Dairy Effluent and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 2, pp. 195–202, 2023.
- [46] A. T. Bender, B. P. Sullivan, L. Lillis, and J. D. Posner, “Enzymatic and Chemical-Based Methods to Inactivate Endogenous Blood Ribonucleases for Nucleic Acid Diagnostics,” *J. Mol. Diagnostics*, vol. 22, no. 8, pp. 1030–1040, 2020.
- [47] K. K. Doddapaneni *et al.*, “Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*,” *Microbiol. Res.*, vol. 164, no. 4, pp. 383–390, 2009.
- [48] H. Cui, L. Wang, and Y. Yu, “Production and characterization of alkaline protease from a high yielding and moderately halophilic strain of SD11 marine bacteria,” *J. Chem.*, vol. 2015, 2015.
- [49] H. S. Joo, C. G. Kumar, G. C. Park, S. R. Paik, and C. S. Chang, “Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and some properties,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 95, no. 2, pp. 267–272, 2003.
- [50] “0652949_A1.pdf.” .
- [51] M. P. Alves, R. L. Salgado, M. R. Eller, P. M. P. Vidigal, and A. Fernandes de Carvalho, “Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity,” *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 10, pp. 7842–7851, 2016.
- [52] D. G. Angeler *et al.*, “EPA Public Access,” *Adv. Ecol. Res.*, vol. 60, no. 218, pp. 1–24, 2019.
- [53] B. Ismail and S. S. Nielsen, “Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry,” *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 11, pp. 4999–5009, 2010.