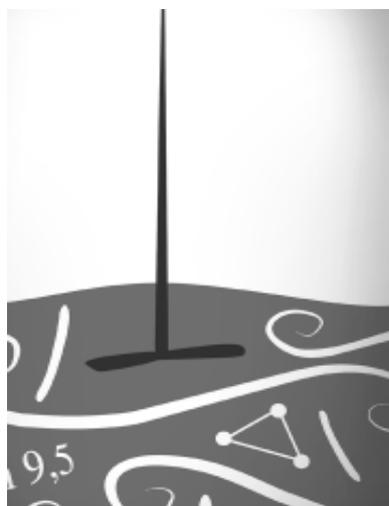


Aplicación

de la metodología ZERI en la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus sp.*



Catalina Giraldo Estrada

Ingeniera de Procesos. Profesora de Cátedra del Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT.

cgiraldo@eafit.edu.co

Alex Armando Sáez Vega

MSc. en Biotecnología. Profesor del Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT.

asaesz@eafit.edu.co

Olga Inés Montoya Campuzano

MSc. en Microbiología. Profesora de la Facultad de Ciencias y Directora del Laboratorio de microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

oimontoy@epm.net.co

Recepción: 25 de abril de 2003 | Aceptación: 10 de julio de 2003

Resumen

Se determinó la posibilidad de producir medios de cultivo a partir de desechos como agua de lavado de papa (ALP) e hidrolizado de polvo de esmeril de cuero (PEC) para la producción de proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus sp.* Alcalofílico. El crecimiento de la cepa y la producción de proteína verdadera no son afectados por los pH de inoculación de 7.0, 8.5 y 9.5, en contraste con la actividad enzimática, que tuvo su mejor resultado a pH inicial de 9.5, el cual fue seleccionado para evaluar dos fuentes de nitrógeno orgánico (PEC y peptona) en ALP a diferentes relaciones C/N (entre 0 y 4). Al evaluar diferentes concentraciones de las fuentes de nitrógeno, se encontró que la mayor producción de proteína para el intervalo estudiado de relaciones C/N se da cuando C/N es 3, al 0.5% de almidón y peptona, similar al valor máximo obtenido usando PEC, 1% de almidón y relación C/N de 1, esta similitud permite recomendar esta enzima para estudios posteriores en la elaboración de medios tendientes a disminuir el impacto ambiental dentro del concepto de cero emisiones (ZERI).

Palabras Claves

Bacillus subtilis / ZERI / proteasas alcalinas

Abstract

The possibility of producing culture means from waste, such as water resulting from potato washing (PW) and hydrolyzed dust from leather (HDL), for the production of alkaline proteases from a native culture of *Bacillus sp.* Alcalophilic was determined. The growth of the microorganism and the production of the true protein are not affected by the inoculation pH of 7.0, 8.5 and 9.5. This differs to the enzymatic activity that had its best results at pH of 9.5, which was selected to evaluate two organic nitrogen sources (HDL and peptone) in PW at different C/N ratios (between 0 and 4). After evaluating different concentration of nitrogen sources, the highest protein production was when C/N is 3, with peptone and concentration of starch of 0.5%, similar to the maximum value obtained using HDL with 1% of starch and C/N of 1. These similarities allow us to suggest this enzyme for further studies in the making of culture medias with the goal of reducing environmental impact framed on the concept of ZERI.

Key Words

Bacillus subtilis / ZERI /
Alkaline proteases

Introducción



En nuestro país, se deben buscar sustratos de bajo costo que puedan utilizarse para producir enzimas. Mazza, encontró que las mayores concentraciones enzimáticas para una cepa de *Bacillus subtilis* se obtenían en medios con almidón y lactosa principalmente. (1977). En este proyecto se utilizó el agua de lavado de papa, con un contenido de almidón del 0.1%, y el hidrolizado de polvo de esmeril de cuero como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, en la elaboración de un medio de cultivo viable en la producción de proteasas alcalinas a partir de una cepa nativa de *Bacillus sp.* Alcalofílico. Aunque también se usan industrialmente medios como harina de soya, harina de avena, entre otros, se decidió utilizar estos sustratos con el fin de determinar la posibilidad de disminuir las cargas contaminantes de algunas industrias como las de papas fritas y curtiembres, a la vez que se está generando valor agregado a estos desechos, enmarcados en la metodología de cero emisiones (Pauli, 1997).

Las proteasas son endopeptidasas que actúan sobre las proteínas hidrolizando enlaces peptídicos, éstas pueden ser, metaloproteasas que trabajan a pH óptimo de 7.0; esterasas, enzimas con alta actividad esterolítica y baja actividad proteolítica y serin-proteasas (proteasas alcalinas). Desde 1967 se conoce que las cepas de *Bacillus* que crecen a pH por encima de 10 sintetizan enzimas que presentan alta actividad proteolítica, son activas y estables a pH hasta 12, temperaturas relativamente altas y poseen puntos isoeléctricos extremadamente básicos. Son enzimas extracelulares, cuya máxima producción se da durante la esporulación, se sabe además, que algunos aminoácidos inhiben la producción de proteasas alcalinas y otros la potencian porque afectan la esporulación de la bacteria (Doering, 1972; Donnellan, 1964; Moon, 1993; Pérez, 1987).

Son estabilizadas por el ion Ca^{2+} (Pérez, 1987; Simoncini, 1987), exhiben su actividad óptima a pH entre 9 y 11 y se utilizan como aditivos para jabones y detergentes, así como en la tenería y textiles. En este trabajo se evalúa una cepa de *Bacillus* que ha mostrado gran potencial en la producción de este tipo de enzimas (Montoya, 1997). Entre las cepas de *Bacillus*, las proteasas alcalinas más importantes son las del tipo serina, dentro de las que se encuentran las llamadas Subtilisin, siendo las producidas por *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* las

más estudiadas en el área industrial (Aunstrup, 1972; Christianson, 1994).

1. Métodos

Se utilizó la cepa nativa 5A7.1 de *Bacillus* sp Alcalofílico, aislada por Montoya en suelo con pH 8.6 (Montoya, 1997). La cepa liofilizada se inocula en LB a pH 7.0 en 10 mL, a 200 rpm, 12 horas, a 30°C, se adecua a diferentes pH en medio ALP.

Para la elaboración de los medios de cultivo se emplearon los desechos ALP y PEC, el cuál se hidrolizó mediante ebullición con HCl concentrado durante 24 horas, seguido de la remoción del material sólido no hidrolizado. Posteriormente, se neutralizó con Na_2CO_3 . El nitrógeno en el hidrolizado se determinó por Micro- Kjeldahl, obteniéndose un 5% de nitrógeno. El ALP presentó un valor de 0.1% de almidón. Para los porcentajes de (1%, 0.5% y 0.2%), se complementó con almidón comercial.

1.1 Curvas de crecimiento y producto en ALP a diferentes pH iniciales

Se inoculó 5% a todas las muestras de distintos pH. El medio se ajustó a pH 7.0, 8.5 y 9.5, posteriormente se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos a 15 psi. Para determinar el efecto del pH de inoculación sobre la cinética de crecimiento, actividad enzimática y producción de proteína verdadera, se realizaron los tratamientos por triplicado y se tomaron muestras a tiempos entre 0 y 48 horas, a intervalos de 4 horas, se centrifugaron a 4°C, 5000 rpm durante 30 min. El crecimiento celular se cuantificó a una longitud de onda de 400 nm. (Montoya, 1997). La actividad enzimática se determinó del sobrenadante, mediante el método USP (Van Velzen, 1976). La proteína verdadera se cuantificó por el método de Lowry (Lowry, 1951).

1.2 Efecto del nitrógeno sobre la actividad enzimática

Para evaluar el efecto de dos fuentes de nitrógeno, se determinó la actividad enzimática en USP, usando como medio ALP. La concentración de

nitrógeno se ajustó a relaciones molares C/N entre 0 y 4, con intervalos de 0.5 para las fuentes peptona y PEC. El efecto de la relación C/N fue evaluado a cuatro concentraciones de ALP (1%, 0.5%, 0.2%, 0.1% p/v) y a pH 9.5 que mostró mejor actividad enzimática. Las diferencias entre los tratamientos, teniendo en cuenta las comparaciones entre las relaciones C/N, fueron estimadas mediante análisis de varianza con un $\alpha = 0.05$.

2. Resultados y discusión

2.1 Efecto del pH sobre el crecimiento, actividad enzimática y producción de proteína verdadera en ALP

El mayor crecimiento se presenta a pH de 7.0, pero no existen diferencias significativas entre curvas, lo que indica que los pH usados no afectan el crecimiento. La fase de adaptación prácticamente nula, indica que el *Bacillus* sp. tuvo una buena afinidad por el medio de cultivo.

En la figura 2, se evidencia la mayor actividad enzimática a un pH de 9.5, cuyo máximo se da a un tiempo de 32 horas, lo que demuestra que la síntesis de enzimas se presenta en la fase estacionaria durante la esporulación y que además éstas son metabolitos secundarios. A pH 7.0 y 8.5 no se presentan diferencias muy significativas, lo que sí ocurre con el pH 9.5. Por esto se decidió usar este pH, para experimentos posteriores.

En la figura 3, se observa que la mayor concentración de proteína verdadera se presenta a pH 7 y no al pH de 9.5 como la actividad enzimática, esto se explica, debido a que el *Bacillus* sp sintetiza otras enzimas además de las proteasas alcalinas como las α -amilasas cuya síntesis se ve beneficiada a pH de 7. (Colin, 1989)

2.2 Efecto del nitrógeno sobre la producción de proteína verdadera a diferentes porcentajes de almidón y relaciones C/N a pH 9.5

Se encontró que la máxima concentración de proteína verdadera (en ppm) se presenta con

peptona, a una relación C/N de 3.0 y un porcentaje de almidón de 0.5%, siendo este valor 52.19 $\mu\text{g/ml}$. El máximo valor de concentración de proteína verdadera para PEC se presenta a una relación C/N de 1 y un porcentaje de almidón de 1% siendo éste 42.7574 $\mu\text{g/ml}$, valor muy similar a la máxima concentración de proteína verdadera obtenida con la peptona como fuente de Nitrógeno (52.1874 $\mu\text{g/ml}$).

De las figuras 4, 5, 6, y 7 se observa que no hay diferencias significativas entre las dos curvas que

representan las fuentes de Nitrógeno: PEC y peptona; mientras que, a medida que se aumenta el porcentaje de almidón se presenta un aumento en la concentración de proteína verdadera.

En cuanto a las relaciones C/N, los valores que se encuentran entre 0.5 y 1 son los que registran mayor concentración de proteína verdadera en cada una de las figuras, es decir, para todos los porcentajes de almidón, la mayor concentración de proteína verdadera corresponde a las relaciones C/N de 0.5 y 1.

Figura 1. Efecto del pH sobre el crecimiento en medio de cultivo ALP al 0.1%

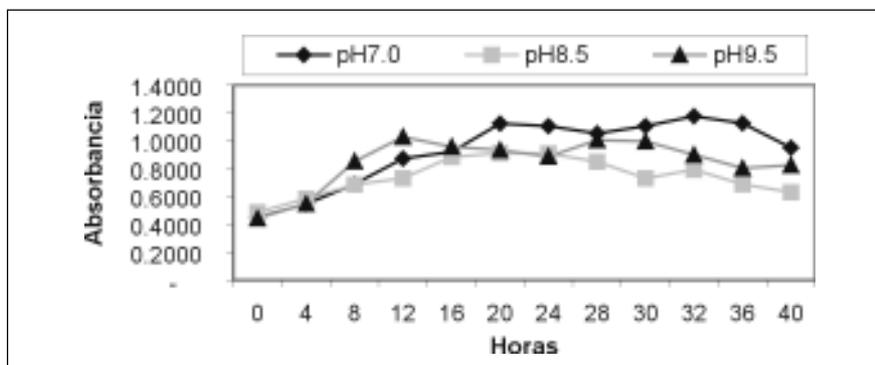


Figura 2. Efecto del pH en la actividad enzimática en ALP 0.1%

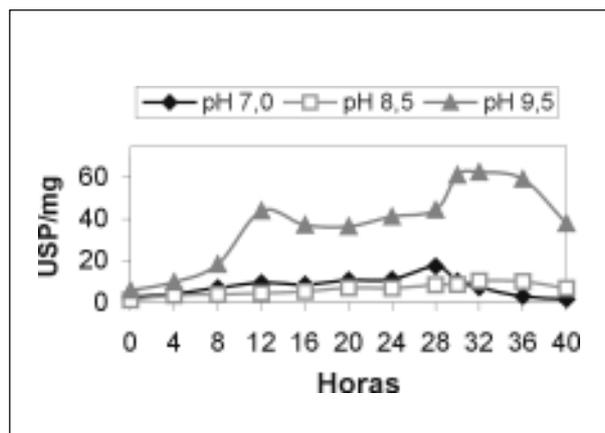


Figura 3. Efecto de pH en producción de Proteína verdadera en ALP 0.1%

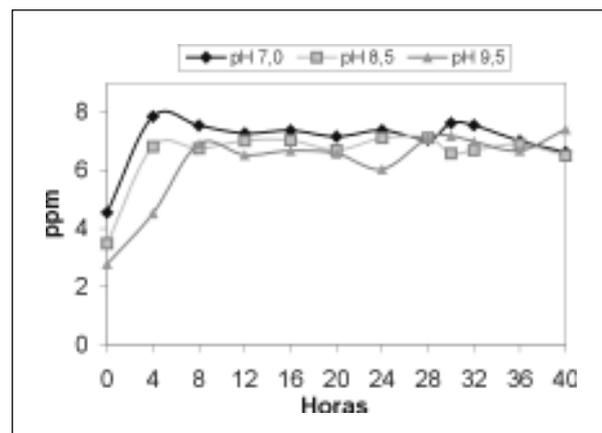


Figura 4. Efecto del Nitrógeno en la producción de proteína verdadera en ALP 0.1%

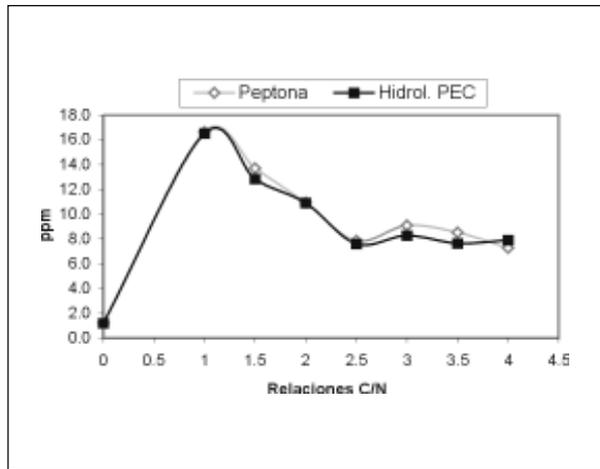


Figura 5. Efecto del Nitrógeno en la producción de proteína verdadera en ALP 0.2%

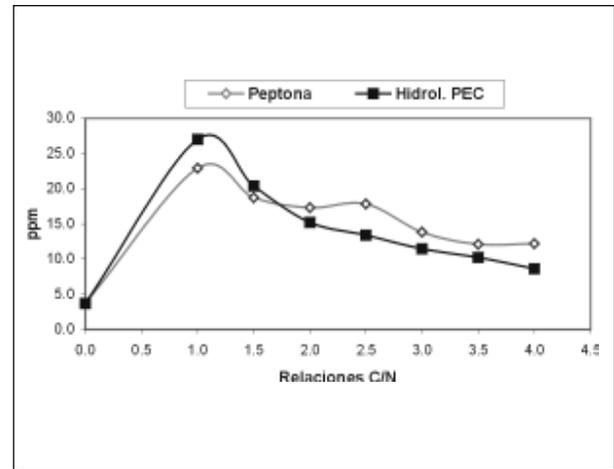


Figura 6. Efecto del Nitrógeno en la producción de proteína verdadera en ALP 0.5%

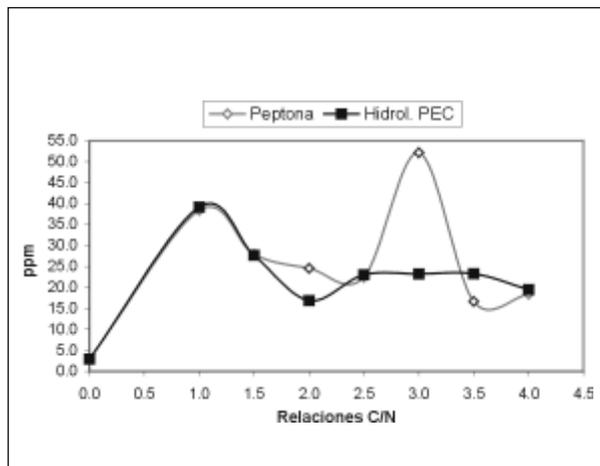
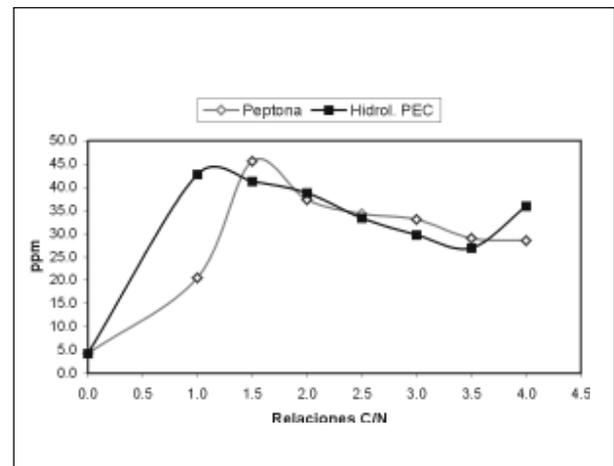


Figura 7. Efecto del Nitrógeno en la producción de proteína verdadera en ALP 1.0%



Comparando los valores obtenidos de F_0 con $F_{crítico}$, en la Tabla 1, se puede observar que todas las variables que intervienen en el diseño de experimentos y sus interacciones son significativas, es decir, todas tienen un efecto importante sobre los resultados, siendo el % de almidón el más significativo y la fuente de Nitrógeno la menos significativa.

Tabla 1. Tabla ANOVA

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados Libertad	Media Cuadrados	F ₀	F Crítico
FUENTE N	20,23	1	20,23	7,41	3,92
% ALMIDÓN	12653,36	3	4217,79	1544,45	2,68
C/N	10165,62	7	1452,23	531,77	2,08
F*ALM.	231,90	3	77,30	28,31	2,68
F*C/N	783,78	7	111,97	41,00	2,08
ALM*C/N	3972,92	21	189,19	69,28	1,64
F*ALM*C/N	1376,76	21	65,56	24,01	1,64
ERROR	349,56	128	2,73		
TOTAL	29554,12	191			

Conclusiones

El mejor pH para el crecimiento del *Bacillus sp* es de 7.0, coincidiendo con el mejor pH para la concentración de proteína verdadera. Sin embargo, el mejor pH para la actividad enzimática es de 9.5, además se da la mayor producción de la enzima durante la fase estacionaria confirmando que es un metabolito secundario.

Según el análisis de las interacciones triples de los factores analizados, la mejor fuente de nitrógeno es la Peptona, el mejor porcentaje de almidón es 0.5% y la mejor relación C/N es 3.

Al analizar los medios de cultivo obtenidos con la fuente alternativa (PEC), de la interacción triple, se encuentra que el medio de cultivo conformado por el PEC, 1% de almidón y relación C/N de 1, a una temperatura de 30°C, una agitación de 200 rpm y un pH de 9.5, presenta una concentración de proteína verdadera similar a la máxima producida. Además, este medio de cultivo presenta una mayor concordancia con los resultados obtenidos en las interacciones dobles y con el análisis individual de las variables de porcentaje de almidón y relación C/N. Por lo tanto, se concluye que la Peptona puede ser reemplazada por PEC. Otra razón por la que se llega a esta conclusión es que la fuente de nitrógeno es un factor importante, pero es mucho menos significativo que el porcentaje de almidón.

Al comparar el máximo valor de actividad enzimática obtenido al analizar la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus sp*. (61.0185 USP/mg) con el de la Pancreatina comercial (25 USP/mg) se encuentra que las proteasas alcalinas obtenidas tienen muy buenas características de actividad enzimática.

De los resultados obtenidos y de su análisis estadístico, se puede concluir que se presenta una alta viabilidad de producir medios de cultivo a partir de los desechos de polvo de cuero y de agua de lavado de papa, para la producción de proteasas alcalinas a partir de *Bacillus sp.*

Aunque el polvo de esmeril de cuero contiene Cr^{+3} el crecimiento del microorganismo no se inhibió, lo que demuestra que la cepa no es sensible a este elemento, por lo que se pueden hacer posteriores estudios fisiológicos.

Este trabajo, se enmarca dentro de la filosofía ZERI ya que ayuda a minimizar la carga contaminante producida en este tipo de empresas. Se recomienda evaluar otros desechos en la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus sp.*

En la producción de proteasas alcalinas a partir de *Bacillus sp* se recomienda emplear el medio de cultivo elaborado con el hidrolizado de polvo de cuero, con 1% de almidón y con relación C/N de 1, debido a que éste permite obtener una buena concentración de proteína verdadera y por lo tanto una buena actividad enzimática, además de presentar unos bajos costos de elaboración por ser desechos industriales. Las concentraciones de proteína verdadera obtenidas con el medio de cultivo elaborado con estos desechos, determinan la posibilidad de realizar más estudios tendientes a la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus sp.* y evaluar la enzima en los diferentes procesos para observar su comportamiento frente a las comerciales.

Bibliografía

Aunstrup, Knud, et al. (1972) Alkaline proteases produced by a *Bacillus*. Patente US 03674643.

Aunstrup, Knud, et al. (1973) Proteolytic enzymes, their production and use. Patente US 03723250.

Avignone, R.C. y Yantorno, O. (1990) "Organic and inorganic nitrogen sources ratio effects on Bt." En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. No. 6. pp. 7-31.

Brown, David A.; Simmons, John D. y Van Meeteren, Hendrik W. (1993) Process for preparing improved hydrolyzed protein. US Patent. 5401527.

Christianson, T. et al. (1994) Alkaline proteases variants with increases stability. Patente US 5 340 735.

Colin R, Harwood. (1989) *Bacillus*. New York: Plenum Press. ISBN: 0-306-43137-8

Doering, J.L. And Bott, K.F. (1972) En: *Journal Applied Bacteriology*. No 1 pp112 .

Donnellan, J.E. (1964) En: *Journal Applied Bacteriology*. Nº2. pp. 87.

Durán, Jorge y Trujillo, Julián. (1979) Manual de análisis aplicado. AOAC Oficial Method 960.52 Microchemical Determination of Nitrogen: MicroKjendahl Method. Capítulo 12, p. 7.

Eunice, A. y Tyson, R. (1993) "Growth and physiological characteristics of *Bacillus subtilis* L-forms". En: *J. of Applied Bacteriology*. V.74. p. 588-594.

Fujiwara, Nobuaki y Yamamoto, Kazuhiko. (1987) Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus sp.* and properties of the enzyme". En: *J. Ferment. Technol.* No. 3. Vol. 65. pp. 345-348.

Giraldo, Gloria y Gómez, Álvaro. (1999) Selección del mejor medio de cultivo para la obtención de proteasas alcalinas de la cepa nativa

Bacillus sp. Alcalofílico. Medellín. Tesis. Universidad de Antioquia.

Gordon, R.E.; Haynes, W. y Pong, C. (1973) "The genus *Bacillus*". Agriculture Research Service. United States Department of Agriculture. En: *Agriculture Handbook*. No. 427. p. 100-120.

Heineken, F.G. y O'Connor, R.J. (1972) "Continuous culture studies on the Biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411". En: *Journal of General Microbiology*. Vol. 73, pp. 35-44.

Jagnow, Gerhard y Dawid, Wolfgang. Introducción con Experimentos Modelo. Zaragoza : Acribia, s.f.

Kurita, W. (1993) Thermostable alkaline protease production. JP Patent. 4190 90.

Lowry, O.H, et al. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol, reagent". En: *J. Biol. Chem.* No. 193. pp. 265-275.

Mazza, et al. (1997) Producción de proteasas alcalinas. Fotocopia 622.

Montoya, Dolly. (1998) Tecnología de Enzimas. Primer Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Memorias. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Santafé de Bogotá.

Montoya, Olga Inés y Pabón, C. (1997). Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus* sp. Alcalofílicas y obtención de proteasas alcalinas.

Santafé de Bogotá. 126 p. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.

Moon, SH. And Parulekar, S.J. (1993) *Biotech and Bioeng.* 41. Nº1.

Pauli, Gunter. (1997) Upsizing. Manizales: Ciencia Generativa. 220p.

Pérez, D. et al. (1987) Ciencias Biológicas. Cuba: s.n.

Priest, F. (1977) "Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*." En: *Bacteriological rews.* Vol 41. pp. 711-753.

Sáez Vega, Alex A. (2001) Efecto del nitrógeno y la aflatoxina B₁ en la actividad enzimática de proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp. Medellín. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 85 p.

Satyanarayana, T. y Sene, Shalini. (1993) "Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40". En: *Indian Journal of Microbiology* No. 33. Vol 1. pp. 43-47.

Simoncini, A. (1987) *J. Of American Leather Chemistry Association.* Vol. 82.

Tsuru, D. et al. (1993). "Zinc protease of *B. subtilis*". En: *J. Biochem.* No. 113. pp. 101-195.

Van Velzen A. (1976) US Patent. 1,353,317.