

CARACTERIZACIÓN DE DOS BACTERIAS TERMÓFILAS (BP-2 Y BP-4) CON CAPACIDAD PROTEOLÍTICA AISLADOS EN LOS GÉISERES DE CANDARAVE. TACNA - PERÚ

CHARACTERIZATION OF TWO THERMOPHILIC BACTERIA (BP-2 AND BP-4) PROTEOLYTIC CAPACITY WITH ISOLATED GEYSERS CANDARAVE. TACNA - PERU

¹Ana Julissa Naquiche Calero, ¹Ariadna Zatyuri Zúñiga Llanos, ¹Cristina Isabel Ferrer Villena, ¹Israel José Salazar Quispe, ¹Helena Beatriz Zapata Málaga y ²Roberto Castellanos Cabrera.

RESUMEN

El presente trabajo estudia las proteasas alcalinas producidas por dos bacterias termófilas designadas como BP-2 y BP-4. Estas fueron aisladas de sedimentos de los géiseres de Candarave, mostrando capacidad proteolítica en medio sólido. La cepa BP-2 mostró un diámetro de 46 mm del halo de hidrólisis a 50 °C, mientras que la cepa BP-4 mostró un diámetro de 85 mm del halo de hidrólisis a 60 °C. Las bacterias seleccionadas BP-2 y BP-4 degradaron 2,9 g/L de caseína en un tiempo estimado de 51 horas de incubación y 1,5 g/L de caseína en 52 horas de incubación, respectivamente (concentración inicial de 10 g/L de caseína). La máxima actividad proteolítica se alcanzó al final de la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria en las dos bacterias. Los extractos proteolíticos producidos por las bacterias BP-2 y BP-4 actuaron a una temperatura óptima estimada de 57 °C y 64 °C, con un pH óptimo alcalino de 7,7 y 8,0 respectivamente. Del análisis de las secuencias del gen ARNr 16S de cada bacteria se determinó que la bacteria BP-2 tiene 99 % de identidad con la especie *Bacillus licheniformis* y la bacteria BP-4 tiene un 99 % de identidad con la especie *Geobacillus thermoparaffinivorans*.

Palabras claves: Proteasas alcalinas, bacteria termófila, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus thermoparaffinivorans*, ARNr 16S.

ABSTRACT

This paper studies the alkaline proteases produced by thermophilic bacteria designated as BP-2 and BP-4. These were isolated from sediments Candarave geysers, which were shown to have proteolytic capacity on solid medium. BP-2 strain had a diameter of 46 mm the hydrolysis halo at 50 °C, while BP-4 strain showed a diameter of 85 mm the hydrolysis halo at 60 °C. Bacteria selected BP-2 and BP-4 degraded 2,9 g/L casein in an estimated 51 hour incubation time and 1,5 g/L casein in 52 hours of incubation, respectively (initial concentration of 10 g/L casein). The maximum proteolytic activity was reached at the end of the log phase and early stationary phase in both bacteria. Proteolytic extracts produced by BP-2 and BP-4 bacteria acted to an estimated optimum temperature of 57 °C and 64 °C, with an alkaline pH optimum of 7,7 and 8,0 respectively. Sequence analysis of the 16S rRNA gene of each bacterium was determined that the BP-2 bacterium has 99 % identity to the species *Bacillus licheniformis* bacteria and BP-4 have 99 % identity with *Geobacillus thermoparaffinivorans* species.

Keywords: Alkaline proteases, thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus thermoparaffinivorans*, 16S rRNA.

INTRODUCCIÓN

Los termófilos son microorganismos que están adaptados para crecer óptimamente a temperaturas altas (45 °C a 110 °C) (Castillo, 2005). Como consecuencia, estos poseen propiedades macromoleculares únicas a altas temperaturas ya que poseen elevadas tasas metabólicas, sus enzimas físicamente y químicamente estables con altos rendimientos del producto final (Kikani *et al.*, 2010). Las bacterias termófilas son las principales fuentes de enzimas termoestables, suficientemente ventajosas para la industria (Kikani *et al.*, 2010).

Debido al crecimiento de la industrialización, la

demanda de enzimas termoestables ha aumentado enormemente, por su alta termoestabilidad y la viabilidad de los procesos involucrados. Las proteasas constituyen una de las principales enzimas para la industria, alcanzando más del 60 % en el mercado mundial. Se utiliza especialmente en la industria alimentaria, farmacéutica, textil y cuero (Rao *et al.*, 1998).

El presente trabajo tiene como objetivo principal caracterizar la capacidad proteolítica de dos bacterias termófilas (BP-2 y BP-4) aisladas en los géiseres de Calientes-Candarave, Tacna-Perú, lugar más alto del mundo (Cruz *et al.*, 2010) por lo que es de gran importancia e interés científico.

¹ Biólogo Microbiólogo. Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú

² Magister en Bioquímica, Biólogo Pesquero. Jefe del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú

co conocer la biodiversidad de este ambiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

Las bacterias (BP-2 y BP-4) fueron aisladas de los sedimentos de los géiseres de Calientes, Candarave, ubicados en la Cordillera Occidental, en el sur del Perú, a 17° 15' 30" de latitud sur a 4400 m.s.n.m. (Cruz *et al.*, 2010). En dicha zona se muestrearon ocho géiseres, cuya temperatura varió entre 50 y 84 °C y el pH entre 6,2 y 7,5.

Las muestras fueron pre-enriquecidas en medio LB (Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g) a un pH de 7 (Remigio *et al.*, 2012), incubándose a 60 °C por 48 horas. Posteriormente dichas muestras han sido sembradas en agar (leche descremada, NaCl 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O, extracto de levadura 0,5 g y agar 15 g) (Zilda *et al.*, 2012) e incubadas a 60 °C por 48 horas, con el propósito de observar el halo de hidrólisis. Las bacterias que presentaron halo de hidrólisis fueron purificadas y conservadas medio sólido LB. Se evaluó el halo de hidrólisis de las bacterias seleccionadas a 50 y 60 °C por 96 horas.

Evaluación de la degradación de la caseína

Los Matraces de 500 mL con 250 mL de medio de producción de proteasa (caseína 10 g/L en buffer Tris HCl, pH 7,2) fueron inoculados en un 10% (v/v) de caldo LB con crecimiento bacteriano de 10⁷ cel/mL (Ghobadi *et al.*, 2009).

Se determinó la concentración de proteína inicial y final durante 72 horas, evaluándose en un intervalo de 12 horas, según el método de Bradford (Bradford, 1976). Además se realizó el recuento de bacterias utilizando la cámara de Neubauer. El extracto crudo se logró obtener mediante la centrifugación del medio de fermentación a 7000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de la actividad proteolítica. Para lo cual se añadió 100 µL de extracto crudo en 1000 µL con 1 % de caseína en buffer fosfato 50 mM (pH 6 y 7) y buffer Tris HCl 50 mM (pH 8 y 9) (Aqel *et al.*, 2012), determinándose el pH óptimo de la actividad a temperatura de 55 y 60 °C para las bacterias BP-2 y BP-4 respectivamente. Para la determinación de la temperatura óptima se evaluó los valores de 45, 55, 65 y 75 °C con un pH de 7,2.

Extracción de ADN y análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

Para la extracción del ADN genómico de las bacterias termófilas proteolíticas seleccionadas, se utilizó el kit Wizard Genomic DNA Purification, siguiendo el protocolo del fabricante. A partir del ADN genómico se obtuvo los genes ARNr 16S de cada bacteria seleccionada por Macro-gen Inc. Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas a la base de datos del NCBI GenBank (The National center for Biotechnology Information) usando BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS

Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

Luego de seleccionar las dos bacterias termófilas en medio agar leche descremada, dichas bacterias presentaron

un mayor halo de hidrólisis, indicando la hidrólisis de la caseína producida por la enzima proteasa.

La bacteria BP-2 mostró un mayor diámetro de halo de hidrólisis a 50 °C (46 mm) y la bacteria BP-4 mostró un diámetro mayor a 60 °C (85 mm).

Caracterización de las bacterias proteolíticas

El crecimiento bacteriano y la actividad enzimática evaluada por la degradación de la caseína de los cultivos seleccionados se incrementaron gradualmente a medida que avanzó el tiempo de incubación, mostrando la máxima actividad de la enzima después de las 48 horas de incubación al inicio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. (Figura 1).

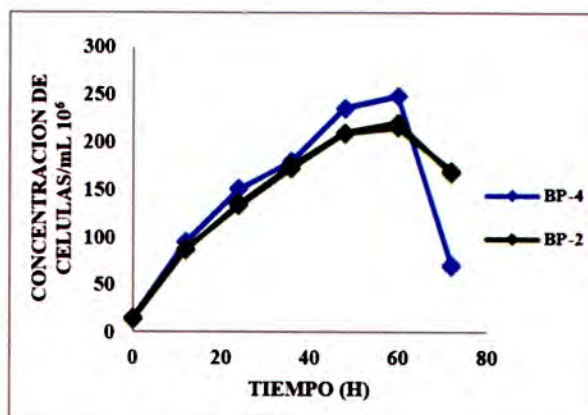


Figura 1. Crecimiento bacteriano de los cultivos BP-2 y BP-4 en el medio de producción.

Las bacterias BP-2 y BP-4 degradaron 2,9 g/L de caseína, en un tiempo estimado de 51 horas de incubación y 1,5 g/L de caseína a las 52 horas de incubación, respectivamente. (Figura 2).

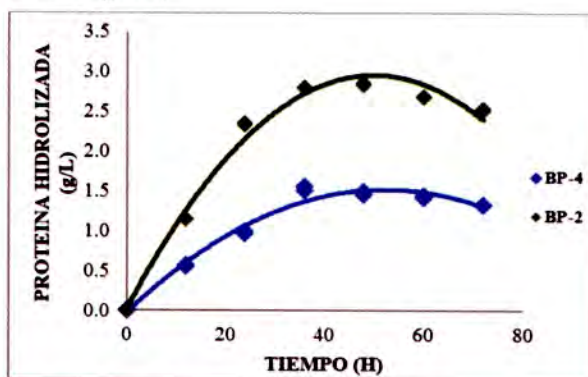


Figura 2. Proteínas hidrolizadas versus Tiempo de fermentación de los extractos proteolíticos producidos por las bacterias BP-2 y BP-4.

Determinación de las condiciones óptimas de la hidrólisis

La temperatura de hidrólisis óptima estimada obtenida de la ecuación del modelo de regresión polinomial (figura 3) resultó 57 °C con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,7 g/L para el cultivo BP-2 y 64 °C con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,6 g/L para la

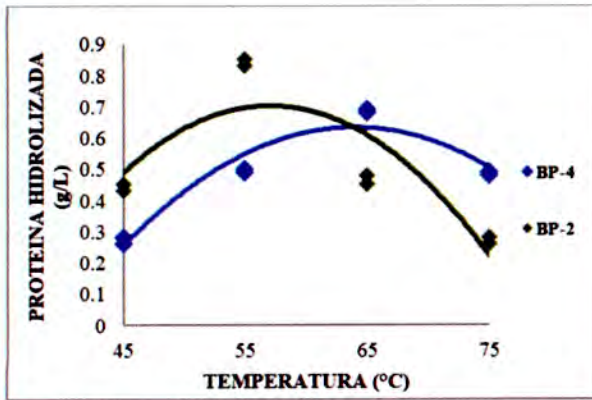


Figura 3. Proteínas hidrolizadas versus temperatura de reacción del extracto proteolítico producidos por las bacterias BP-2 y BP-4.

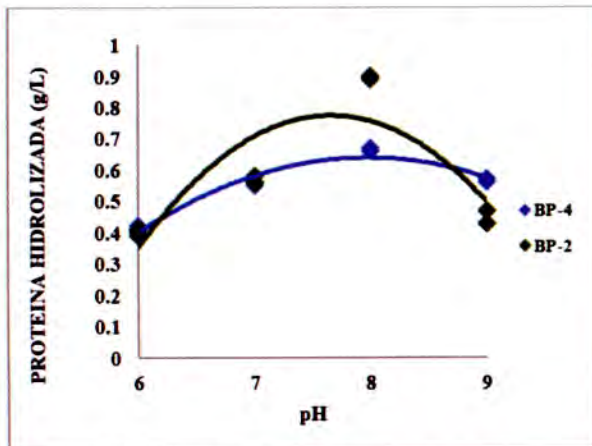


Figura 4. Proteínas hidrolizadas versus pH de reacción del extracto proteolítico producido por las bacterias BP-2 y BP-4.

bacteria BP-4.

El pH óptimo de reacción para el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-2 fue de 7,7, con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,8 g/L y 8,0 y una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,6 g/L para el cultivo BP-4 (figura 4), lo que indica que pueden ser clasificadas como proteasas alcalinas.

DISCUSIÓN

La formación del halo de hidrólisis alrededor de las colonias seleccionadas es resultante de la actividad proteolítica en medio sólido (Habib *et al.*, 2012) a temperatura de incubación de 50 y 60 °C. Los cultivos BP-2 y BP-4 seleccionados tienen la capacidad de producir proteasas extracelulares en el medio agar leche descremada. Este es un medio complejo donde los nutrientes no se encuentran de manera libre, por lo que ambos cultivos produjeron esta enzima para obtener los nutrientes necesarios (García *et al.*, 1992).

El tiempo de incubación juega un papel importante en la producción enzimática. En el presente trabajo, la actividad máxima de la enzima y la degradación de la caseína fue observada poco después de las 48 horas de incubación, al inicio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Los

cultivos BP-2 y BP-4 lograron degradar una concentración de 2,9 g/L de caseína en un tiempo estimado de 51 horas de incubación y 1,5 g/L de caseína a las 52 horas de incubación respectivamente. Estos resultados se ajustan con las observaciones hechas por Sevinc y Demirkan (2011) y Swamy *et al.* (2012) en donde la máxima actividad de la proteasa producida por *Bacillus* sp. y *Comomonas kerstersii* se produjo al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria. Sin embargo, según Qadar *et al.* (2009) informó que *Bacillus subtilis* 3441 presentó una máxima actividad a las 72 horas. La producción de la enzima proteasa puede estar directamente vinculada con el metabolismo activo del cultivo bacteriano (Kanchana & Padmavathy, 2010). Además, Gupta *et al.* (2002) informaron que la producción de proteasa extracelular está relacionada con la deficiencia de nutrientes al principio de la fase estacionaria.

En la determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis de proteína, se obtuvieron proteasas termoestables, con valores de temperatura de 57 y 64 °C para bacterias BP-2 y BP-4, estando dentro del rango establecido por Satyanarayana *et al.* (2013) (50 a 85 °C) para ser consideradas como tales. Así mismo resulta coincidente con otras investigaciones de proteasas bacterianas; reportándose una temperatura óptima de 55 °C para *Bacillus* sp. PCSIR (Swamy *et al.*, 2012) y una temperatura óptima de 60 °C para *Bacillus licheniformis* (Olajuyigbe y Ajele, 2008), mientras que para las especies de *Geobacillus* la temperatura óptima fluctúa entre 50 y 70 °C (Hawumba *et al.*, 2002).

El pH óptimo de la mayoría de las proteasas termófilas se ha encontrado en el rango de 6,0 a 12,0, lo que concuerda con los resultados obtenidos para la bacteria BP-2 y BP-4 obteniéndose valores de 7,7 y 8,0 respectivamente, estos hechos indican que pueden ser clasificados como proteasas alcalinas (Rao *et al.*, 1998). Ageitos (2011) reportó un pH óptimo de 6 a 7,5 para la actividad de la proteasa en *Bacillus licheniformis* USC 13, mientras que Zhu *et al.* (2007) reportaron un pH para la actividad proteolítica de *Geobacillus* sp. YMTC 1049 entre 6 a 9.

El pH óptimo es un parámetro que tiene gran relevancia para determinar el uso de la enzima, en este caso, ambas proteasas tienen gran importancia, ya que ocupan el 25 % del mercado mundial de comercialización de enzimas (Rao *et al.*, 1998). Estas propiedades de las proteasas alcalinas bacterianas las hacen adecuadas para su uso en la industria (Jisha, 2013).

La identificación de las bacterias seleccionadas fue realizada mediante el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. La identidad de las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) a través del BLAST N, resultando la bacteria BP-4 con un 99 % de identidad con *Geobacillus thermoparaffinivorans*, lo cual concuerda con las características macroscópicas y microscópicas observadas para el género *Geobacillus* en la bacteria BP-4. Además, especies de *Geobacillus* han sido aisladas frecuentemente de aguas termales (Malhotra *et al.*, 2000; Noorwez *et al.*, 2006., Obeidat *et al.*, 2012).

Mientras que para la bacteria BP-2 se obtuvo un 99% de identidad para especie *Bacillus licheniformis*. Las características fenotípicas reportadas por esta especie concuerdan

Naquiche, A. *et al.* Caracterización de dos bacterias termófilas (BP-2 y BP-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candarave. Tacna-Perú.

con las características del cultivo BP-2, y es reportada como productora de proteasas (Ghumr *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Se aislaron dos bacterias termófilas productoras de proteasas alcalinas denominadas BP-2 y BP-4 a partir de los sedimentos de los géiseres de Calientes.

La bacteria BP-2 mostró un diámetro de 46 mm del halo de hidrólisis a 50 °C y el cultivo BP-4 también mostró un mayor diámetro 85 mm del halo de hidrólisis de 60 °C.

La máxima hidrólisis de la caseína para las bacterias seleccionadas se produjo al finalizar la fase logarítmica de su crecimiento, siendo a las 51 y 52 horas de crecimiento para las bacterias BP-2 y BP-4, respectivamente.

La actividad de los extractos proteolíticos crudos, evaluada mediante la hidrólisis de la caseína, presentó una temperatura óptima estimada de 57 y 64 °C para cada bacteria, indicando su naturaleza termoestable y un pH óptimo alcalino estimado de 7,7 y 8,0.

De acuerdo al análisis de las secuencias del gen ARN 16S, las bacterias BP-2 y BP-4 tienen un 99 % de identidad a las especies *Bacillus licheniformis* y *Geobacillus thermoparaffinivorans*, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ageitos, J.M. (2011). *Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de Bacillus licheniformis*. (Tesis doctoral). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Farmacia.
- Aqel, H., Al-Quadani, F., Yousef, T. (2012). A novel neutral protease from thermophilic Bacillus strain HUTBS62. *J. BioSci. Biotech.* 1(2): 117-123.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- Castillo, F., Roldan, M.D., Huertas, M.J., Caballero, F., Moreno, C., y Luque, L.R. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tébar SL. 380-386.
- Cruz, V., Vargas, V. and Matsuda, K. (2010). Geochemical Characterization of Thermal Waters in the Calientes Geothermal Field, Tacna, South of Peru. *Proceedings World Geothermal Congress*. Bali, Indonesia.
- García, R., Cocha, J.M., Ramírez, P. y Contreras, G. (1992). *Perfil de exoenzimas de Pseudomonas aeruginosa*. Reuniones científicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Ghobadi, Z., S, Yaghmaei and R, HAJI. (2009). Production of Extracellular Protease and determination of optimal condition by Bacillus licheniformis. BBRC 100053. *IJE Transactions B: Applications*. 22: 221-228.
- Ghumr, P., Shafique, M., Ishtiaq, M., Javed, I., Ahmad, B., Jamal, J., and Hameed, A. (2012). Isolation and screening of protease producing thermophilic Bacillus strains from different soil types of Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*. 6(8): 1663-1668.
- Gupta, R., Beg, Q.K and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *App. Microbiol. Biotech.* 59:15-32.
- Habib, S.M., Fakhruddin, A.N., Begum, S and Ahmed, M. (2012). Isolation and screening of thermostable extracellular alkaline protease producing bacteria from tannery effluents. *J. Sci. Res.* 4 (2): 515-522.
- Hawumba, J.F., Theron, J., Brözel, V. (2002). Thermophilic Protease producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. *Current Microbiology*. 45(2): 144- 150.
- Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradheep, S., Sreedevi, S., Unni, K.M., Sajith, S., Priji, P., Moolakkariyil, S.J and Sailas, B. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research journal*. 1 (3): 39-51 India.
- Kanchana, M. and Padmavathy, S. (2010). Optimization of extracellular alkaline protease enzyme from *Bacillus* sp. *The Bioscan*, 5(1): 85 – 87.
- Kikani, B.A., Shukla, R.J and Singh, S.P. (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Rajkot-360* 005. India.
- Malhotra, R., Noorwez, S.M., Satyanarayana, T. (2000). *Lett Appl/Microbiol* 31:378–384.
- Noorwez, S.M., Ezhilvannan, M., Satyanarayana, T. (2006) *Indian J Biotechnol* 5:337–345.
- Obeidat, M., Khyami, A., Al-Zoubi and Otri. (2012). Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. *African Journal of biotechnology*. 11(25): 6763-6
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, T.O. (2005). Production dynamics of extracellular protease from Bacillus species. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(8): 776-779.
- Qadar S.A., Erum, S., Samina, L., Abida, A. (2009). Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Indian J. Biotechnol* 8: 286-290.
- Rao, M., Aparna, S.G., Monhini, V and Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 597-635.
- Remigio, Z., Muronde, W., Holst, O and Parawira, O. (2012). Isolation and characterization of a protease-producing thermophilic bacterium from an African hot spring. *African Journal of Biotechnology* .11(62): 12571-12578.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., and Kawarabayasi, Y. (2013). *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. Biotechnology of Thermophiles 2da Edition*. Netherlands: Dordrecht-Springer Science+Business Media.
- Sevinc, N. and Demirkan, E. (2011) Production of Protease by Bacillus sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. *J. Biol. Environ. SCI.*, 5(14), 95-103.
- Swamy, k., Kashyap, S., Vijay, R., Tiwari, R and Anuradha, M. (2012). Production and optimization of extra cellular protease from bacillus sp. isolated from soil. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 3 (2): 564-569.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q and Shen, P. (2007). *Enzyme Microb Technol.* 40:1592–1597.

Naquiche, A. *et al.* Caracterización de dos bacterias termófilas (BP-2 y BP-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candarave. Tacna-Perú.

Zilda, D. S., Harmayani, E., Widada, J, Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, G. and Fawzya, Y. N. (2012). Screening of thermostable protease producing microor-

ganisms isolated from Indonesian hot spring. *Squalen* vol. 7 núm. 3, december 2012: 105-114.

Correspondencia:

Ana Julissa Naquiche Calero: julycalero7@gmail.com

Roberto Castellanos Cabrera: roberto_castellanos2002@yahoo.es

Fecha de Recepción: 15/04/2015

Fecha de Aceptación: 16/06/2015