

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

“Producción de proteasas por bacterias de origen marino en
fermentador: optimización de la producción y caracterización
de estas enzimas”

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos
necesarios para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

César Estrada Badillo

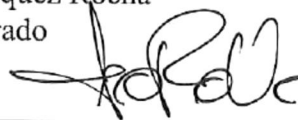
Aprobada por:



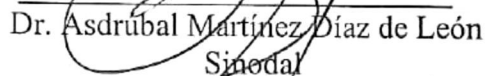
Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Presidente del Jurado



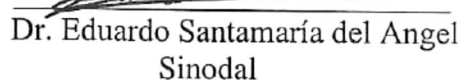
Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte
Sinodal



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Sinodal



Dr. Asdrúbal Martínez Díaz de León
Sinodal



Dr. Eduardo Santamaría del Angel
Sinodal



Dra. Anna Iliná D.
Sinodal

DEDICATORIA

***A mis padres que me dieron su apoyo y confiaron en mí
(César y Gloria)***

***A mis tres hermanas y hermano
(Griselda, Ma. Elena, Rosalía y Ángel)***

***A mis sobrinos
(César, Leslie y Sebastián)***

***A mis Amigos por apoyarme y estar conmigo en cada
una de las decisiones que he tomado***

***A todos los que me ayudaron a culminar esta etapa
de mi vida***

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi padre quien siempre me ha ayudado en cada etapa de mi vida (Isaías 41:10).

A mi Director de Tesis y Amigo el Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha, por haberme dado su apoyo y valiosa asesoría durante la elaboración de este trabajo.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A CONACYT, por el apoyo económico del proyecto UC-MEXUS-CONACYT No. CN-02-104 y beca otorgada durante este doctorado.

A la UA de C, por el apoyo económico como estudiante egresado.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga, por permitir el uso del fermentador y de algunas cepas utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Anna Iliná por el apoyo de equipo y asesoría incondicional durante las etapas de este trabajo y su amistad.

Al Dr. Jorge Olmos por permitir el uso de sus instalaciones y equipo.

A los miembros del Comité de Tesis: Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte, Dr. Jorge de la Rosa Vélez. Dr. Asdrúbal Martínez y Dr. Eduardo Santamaría del Angel, por su ayuda en la realización de los objetivos de este trabajo.

A mis amigos del Departamento de Biotecnología del CICESE.

RESUMEN

En este trabajo se utilizó la bacteria marina *Vibrio harveyi* para la producción de proteasas extracelulares en un bioreactor, con un medio de cultivo en agua de mar. Se utilizó el medio Zobell suplementado con 0.25 % de "skim milk" para el crecimiento y producción de proteasas, incrementando 5 veces su actividad. La producción de enzimas es mayor en la fase exponencial tardía del crecimiento microbiano, teniendo como característica la bioluminiscencia previa a la mayor síntesis de proteínas. Las proteasas producidas tienen un peso molecular de 47, 40 y 35 kDa, determinado por análisis electroforético y zimogramas. La mayor actividad proteolítica se obtuvo a un pH 9, una salinidad de 1.5 % y temperatura de 55 °C. El análisis usando inhibidores indica que la actividad principal es de una serin-proteasa. La bacteria *V. harveyi* fue cultivada en un bioreactor con un volumen de trabajo de 1 L, utilizando un modo de operación en lote. Las condiciones hidrodinámicas de agitación y aireación, muestran que la velocidad específica de crecimiento máxima (μ) alcanzada se obtiene a 0.8 vvm y 700 rpm, con una μ de 0.51 h^{-1} y la mínima utilizando 0.2 vvm y 300 rpm, con una μ 0.05 h^{-1} . La mayor actividad proteolítica se detectó a 700 rpm y 0.85 vvm (3.3 UA). El coeficiente de transferencia de oxígeno k_{La} en agua de mar en el bioreactor incrementa su valor de 0.25 a 1.32 s^{-1} , utilizando 0.2 vvm y 300 rpm y 0.8 vvm y 700 rpm, respectivamente. Estos resultados sugieren que el crecimiento bacteriano y la producción de proteasas están fuertemente influenciados por las condiciones hidrodinámicas del bioreactor.

ABSTRACT

In this work, the marine bacterium *Vibrio harveyi* was used for the extracellular protease in a bioreactor, with a culture medium in marine water. Zobell medium supplemented with 0.25 % of skim milk was used, for growth and protease production, the enzymatic activity was increased five times. The protease production is larger in the late period of the exponential microbial phase, having a previous bioluminescence as a characteristic before protein synthesis. The proteases produced had a molecular weights of 47, 40 and 35 kDa, resolved by electrophoretic and zymogram analyses. The highest proteolytic activity was obtained at pH 9, with a salinity of 1.5 %, and a temperature of 55 °C. The analyses of activity in the presence of inhibitors suggest, that serine-protease is the main activity found. The bacteria *V. harveyi* was cultured in a bioreactor, with a 1 L as work volume, the reactor was operated in a batch mode. The hydrodynamic conditions (agitation and aeration), show that the maximum specific growth (μ) rate found was 0.51 h^{-1} at 0.8 vvm and 700 rpm and the minimum μ observed was 0.05 h^{-1} , using 0.2 vvm and 300 rpm. The largest proteolytic activity (3.3 UA) was detected at 700 rpm and 0.85 vvm. The oxygen transfer coefficient k_{La} of the marine water in the bioreactor increase from 0.25 to 1.32 s^{-1} , using 0.2 vvm and 300 rpm and 0.8 vvm and 700 rpm, respectively. These results suggest that the bacterial growth and protease production are strongly influenced by the hydrodynamic behavior of the bioreactor.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN

1.1. Microorganismos marinos como fuente de enzimas con actividades catalíticas novedosas	3
1.2. Desarrollo de un bioproceso de producción para un microorganismo marino.	5
1.3. Transferencia de oxígeno en bioreactor	7

II ANTECEDENTES.

2.1. Bacterias marinas productoras de enzimas proteolíticas con propiedades novedosas	10
2.2. Condiciones de cultivo para la producción de proteasas	12
2.3. Parámetros operacionales de biorreactores	14
2.4. Planteamiento del problema	15
2.5. Justificación.	16
OBJETIVO	17
Objetivos particulares	17

III MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental.	18
Medio de cultivo y cepas bacterianas.	19
3.1. Identificación de cepas productoras de proteasas extracelulares.	19
3.2. Características de crecimiento en medio líquido de las cepas del género <i>Vibrio</i> .	20

3.2.1. Determinación del crecimiento bacteriano y análisis cinético	20
3.2.2. Determinación de la bioluminiscencia en medio líquido	20
3.3. Purificación y caracterización de enzimas	
3.3.1. Preparación del extracto	21
3.3.2. Caracterización de enzimas.	22
3.3.2.1. Actividad proteolítica utilizando azocaseína	22
3.3.2.2. Sustratos utilizados en la determinación de actividad proteolítica	23
3.3.2.3. Determinación de proteína.	24
3.3.2.4. Determinación de bandas de actividad y peso molecular por tinción con Coomassie y zimogramas .	24
3.3.2.5. Caracterización proteolítica utilizando inhibidores en zimogramas	25
3.3.2.6. Análisis del gel.	26
3.3.2.7. Efecto de inhibidores y algunos iones sobre la actividad	26
3.3.2.8. Determinación del efecto del cloruro de sodio, SDS.	26
3.3.2.9. Energía de activación-inactivación.	27
3.3.2.10. Determinación de la estabilidad de la enzima a la temperatura.	27
3.3.2.11. Efecto del pH.	28
3.4. Crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> en el bioreactor.	28
3.4.1. Preparación del inóculo.	28
3.4.2. Descripción del bioreactor y condiciones del cultivo	28
3.4.3. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de proteasas.	30

3.4.4. Coeficiente de conversión de densidad óptica a peso de biomasa seca	30
3.4.5. Efecto del grado de agitación y aireación sobre el cultivo de <i>Vibrio harveyi</i>	31
3.4.6. Determinación del coeficiente de transferencia de masa kLa	31
3.4.7. Producción extracelular de proteasas.	32

IV RESULTADOS

4.1. Identificación de cepas productoras de proteasas extracelulares	33
4.2. Características de crecimiento en medio líquido de las cepas del género <i>Vibrio</i> .	33
4.2.1. Curva de crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> para la selección del medio de cultivo.	41
4.2.2. Determinación de la bioluminiscencia en medio líquido	44
Expresión de bioluminiscencia en medio sólido.	47
Obtención de las curvas de crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> en diferentes concentraciones de "skim milk".	48
4.3. Purificación y caracterización de proteasas.	52
4.3.2.4 Determinación del peso molecular utilizando zimogramas.	57
4.3.2.5. Caracterización proteolítica utilizando inhibidores en zimogramas	62
Caracterización de proteasas utilizando procedimientos espectrofotométricos.	65
4.3.2.7. Uso de inhibidores de actividad enzimática	65

Sustratos utilizados en la determinación de actividad proteolítica.	66
4.3.2.8. Determinación del efecto de la concentración de cloruro de sodio	68
Determinación del efecto de la temperatura.	70
4.3.2.9. Determinación de la Energía de activación	71
4.3.2.10. Determinación de la estabilidad de la enzima a la temperatura.	72
Caracterización enzimática utilizando Suc-AAPF-Na.	74
Determinación de la Energía de activación	77
Determinación de la estabilidad de la enzima	78
Determinación del pH de actividad quimiotripsina	80
4.4. Estudios en fermentador	
4.4.3. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de proteasas en fermentador	81
4.4.4. Coeficiente de conversión de densidad óptica a peso de biomasa seca.	82
4.4.5. Efecto del grado de agitación y aireación sobre el cultivo de <i>Vibrio harveyi</i>	85
4.4.6. Determinación del coeficiente de transferencia de masa kLa	86
4.4.7. Producción extracelular de proteasas	88
IV.- DISCUSIÓN	90
V.- CONCLUSIONES	95
VI.- LITERATURA CITADA	96
VII.- ARTÍCULO PUBLICADO	105

Índice de Tablas

Tabla I. Crecimiento y actividad proteolítica de algunas cepas de <i>Vibrio</i> a los nueve días de cultivo	40
Tabla II. Resultados de la bioluminiscencia colonial observada a simple vista para cada uno de los medios cada 24 h.	48
Tabla III. Evaluación de las etapas de purificación del extracto crudo de <i>Vibrio harveyi</i> utilizando azocaseína como sustrato.	56
Tabla IV. Actividades relativas reportadas en % de las áreas de actividad del zimograma (Quantity One).	64
Tabla V. Efecto de algunos inhibidores sobre la actividad azocaseinolítica	66
Tabla VI. Sustratos utilizados en las determinaciones de actividad	67
Tabla VII. Valores de μ (taza específica de crecimiento h^{-1}) a diferentes grados de agitación y aireación.	85
Tabla VIII. KL_a y DO_{max} (máxima concentración de oxígeno) en agua destilada y agua de mar.	88
Tabla IX. Rendimiento de proteína y actividad proteolítica ($UA\ mg^{-1}$) obtenidas en las dos últimas horas de cultivo.	89

Indice de Figuras

- Figura 1. Descripción de las medias del fermentador (Applikon, Holland) 29
- Figura 2. Cultivos bacterianos de las bacterias a) *Vibrio* spp. b) *Vibrio damsela* c) *Vibrio holisae* d) *Vibrio fishery* e) *V. harveyi* evidenciando la producción de proteasas. 34
- Figura 3. Curva de crecimiento y de producción extracelular enzimática de *Vibrio* spp. en diferentes medios de cultivo: Z (- -), y ZSM (- -). 35
- Figura 4. Curva de crecimiento (eje principal) y de producción enzimática de *V. damsela* en diferentes medios de cultivo: Z (- -), y ZSM (- -). 36
- Figura 5. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio holisae* en diferentes medios de cultivo: Z (- -), y ZSM (- -). 37
- Figura 6. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio fishery* en diferentes medios de cultivo: Z (- -), y ZSM (- -). 38
- Figura 7. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio harveyi* en diferentes medios de cultivo: Z (- -), y ZSM (- -). 39
- Figura 8. Curva de crecimiento y actividad proteolítica del cultivo de *Vibrio harveyi*, en dos medios: Z (- -), y ZSM (- -). Línea continua (densidad óptica) y líneas punteadas actividad enzimática. 42
- Figura 9. Comportamiento de la concentración de proteína en los medios Z (- -) y ZSM (- -) líneas continuas, en líneas discontinuas actividad proteolítica específica (UA/mg) 43
- Figura 10. Comportamiento bioluminiscente del cultivo de *Vibrio harveyi* en dos medios de cultivo Z (- -) y ZSM (- -). 45

Figura 11.- Característica espectral de la Intensidad bioluminiscente de *Vibrio harveyi*. En la curva de arriba se presentan las lecturas previa intensa agitación de las muestras de cultivo, la curva de abajo la misma muestra sin agitación. Estas lecturas fueron obtenidas sin la adición de activadores de la bioluminiscencia utilizando un espectrofluorómetro Shimadzu RF540. 46

Figura 12. En esta fotografía se observa como es el progreso de la expresión de la actividad bioluminiscente del cultivo de *Vibrio harveyi* en medio ZSM. 47

Figura 13. Curvas de crecimiento de *Vibrio harveyi* empleando diferentes concentraciones de "skim milk": 0(- -), 0.25(- -), 0.50(- -), 0.75(- -) y 1.0(-x-) % 49

Figura 14. Determinación de la actividad proteolítica correspondiente a la curva de crecimiento de la concentraciones de "skim milk": 0(- -), 0.25(- -), 0.50(- -), 0.75(- -) y 1.0(-x-) % . 51

Figura 15. Elusión de proteínas utilizando una columna de DEAE celulosa. En el eje Y lecturas a 280 nm, en eje secundario Y se presenta la concentración de cloruro de sodio utilizado para la elusión. En el eje X se presenta el número de fracciones. 53

Figura 16.- Zimograma de cada una de las fracciones proteicas (columna DEAE-celulosa). Carriles 1 y 3 concentrado de extracto crudo, 2.-

marcador de peso molecular, 4 -12 distintas fracciones obtenidas de la columna DEAE-celulosa	54
Figura 17. Electroforesis a) SDS-Page 5.- Marcador de peso molecular, 6,7 fracción purificada. b) carriles 6' y 7' zimograma.	55
Figura 18.- Zimograma de los extractos crudos del cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> en dos medios de cultivo, el tipo Z y ZSM, los carriles 4 y 5 con 1.7 µg de proteína, carriles 5 y 6 con el mismo volumen.	58
Figura 19. Relación de pesos moleculares de los marcadores de amplio rango y su respuesta en movilidad relativa sobre gel de acrilamida al 12 %.	59
Figura 20. Zimograma de los extractos crudos bacterianos: carriles 1. <i>Vibrio harveyi</i> , 2. <i>Vibrio spp.</i> , 3. <i>Vibrio fishery</i> , 4. <i>Vibrio damsela</i> , 5. <i>Vibrio holisae</i> , en medio Zobell 6. Marcador de peso molecular, 7. <i>Vibrio harveyi</i> , 8. <i>Vibrio spp.</i> , 9. <i>Vibrio fishery</i> , 10. <i>Vibrio damsela</i> , 11. <i>Vibrio holisae</i> , en medio ZSM.	61
Figura 21. Zimograma del extracto crudo de <i>Vibrio harveyi</i> incubado ante la presencia de diferentes inhibidores, 1 y 2) extracto crudo sin inhibidor, 3 marcador de peso molecular, 4-12) diferentes inhibidores.	63
Figura 22. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la mezcla de reacción sobre la actividad enzimática.	69
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica (UA/mg) del extracto crudo (dializado).	70

- Figura 24. En esta figura se presenta en el eje Y el ln de la actividad específica versus el inverso de la temperatura en °K. La pendiente de la recta es (-Ea/R) 71
- Figura 25. Actividades remanentes del extracto crudo después de un periodo de incubación de 30 minutos ante diferentes temperaturas. 73
- Figura 26. Efecto de la concentración de substrato presente en la reacción de determinación de actividad tipo quimiotripsina. 75
- Figura 27. Comportamiento de la actividad tipo quimiotripsina del extracto crudo (dializado) ante diferentes temperaturas. 76
- Figura 28. ln de la actividad tipo quimiotripsina versus el inverso de la temperatura en °K. La pendiente de la recta es (-Ea/R). 77
- Figura 29. Actividad quimiotripsina remanente en el extracto crudo. 79
- Figura 30. Actividades específicas del extracto crudo (dializado) ante diferente pH. 80
- Figura 31. Gráfica de relación de peso seco (mg/mL) Vs absorbancia (600 nm) del cultivo de *Vibrio harveyi* 82
- Figura 32. Cultivo de la cepa *Vibrio harveyi* en fermentador. A) fotografía tomada con luz y B)oscuridad utilizando videofilmación. 83
- Figura 33. Curva de crecimiento y de producción de actividad proteolítica del cultivo de *Vibrio harveyi* en dos medios de cultivo: Eje principal Y en escala logarítmica, representado en líneas, el medio Z (- -), y ZSM (- -).

En eje secundario Y en líneas punteadas Actividad enzimática específica (UA/mg) en SN de Z (- -), y ZSM (-Δ-). 84

Figura 34. Curva de crecimiento y producción de proteasas de *Vibrio harveyi* ante diferentes grados de agitación y con 0.8 vvm de flujo de aire. Símbolos: 300 (■), 500 rpm (▲), 700 rpm (▼). Las líneas sólidas representan el crecimiento y las líneas punteadas representan la actividad proteolítica. 88

Abreviaturas

AM	Agar marino
SN	Sobrenadante del medio de cultivo
Z	Medio de cultivo Zobell
ZSM	Medio de cultivo Zobell + 0.25 % de "skim milk" grado bacteriológico
SM	"skim milk" grado bacteriológico
A_{600}	Absorbancia a 600 nm
AE_{esp}	Actividad enzimática proteolítica específica
BSA	Albúmina de suero bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'-Tetra-methyl-ethylendiamino
Trizma (Tris-HCl)	Tris [hydroxymethyl] amino metano
Bacto TM peptone	Proteína digerida enzimáticamente
DEAE Cellulose	Dietilaminoetil cellulose
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
TLCK	Cetona de tosil-lisina-clorometilo
TPCK	Cetona de tosil-fenilalanina-clorometilo
ZPCK	Cetona de carboxibenzoxi-alanina-glicina-fenilalanina-clorometilo
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis-(b amino etil éter) N,N,N',N' ácido tetraacético
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
K_m	Constante de Michaelis Menten
V_{max}	Velocidad máxima
k_{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno
BAPNA	N-benzoil-DL-arginil p-nitroanilida
Suc-AAPF-NA	Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos representan una fuente atractiva de enzimas proteolíticas que a diferencia de otras fuentes como animales y vegetales, éstas pueden ser obtenidas en un periodo de tiempo relativamente corto, usando procedimientos de fermentación establecidos o adaptados y que producen abundantemente el producto deseado. Además, en general las proteasas microbianas son extracelulares en la naturaleza y son secretadas directamente al medio por lo que en la fermentación, esto simplifica el proceso de recuperación de producto "downstream processing" (recuperación-producción) comparado con las proteasa obtenidas de fuentes vegetales y animales. Las proteasas son importantes para diversas industrias entre ellas la alimenticia, en la elaboración de hidrolizados proteicos, vinos, productos lácteos (Godfrey y West, 1996), saborizantes y síntesis de aminoácidos (Madigan *et al.*, 1999). Otra característica de las enzimas microbianas es que poseen una vida media larga y pueden ser almacenadas por periodos prolongados sin una pérdida significativa de su actividad.

Para el desarrollo de un proceso de fermentación y producción de enzimas para la industria, conocer los parámetros de fermentación, las estrategias de purificación y las propiedades biocatalíticas de las enzimas es de vital importancia. El proceso de fermentación para la producción de proteasas puede ser regulado variando la relación carbono/nitrógeno del medio y éste puede ser escalado usando cultivo en lote o continuo, prolongando así la fase estacionaria del cultivo, aumentando así el producto

deseado. La producción de proteasas es algo inherente en todos los organismos, pero solo aquellos microbios que producen una cantidad sustancial de proteasas extracelulares han sido utilizados comercialmente, como el género *Bacillus* que domina el mercado (Manchini y Fortina, 1998).

Las proteasas microbianas alcalinas dominan el mercado mundial de las enzimas, llegando a ser dos terceras partes de las utilizadas en la industria de los detergentes (Green, *et al.* 1996). Las bacterias han sido el grupo dominante para la producción de proteasas alcalinas, siendo el género *Bacillus* la principal fuente. El género *Bacillus* ha sido aislado de diferentes ambientes, aunque las cepas con mayor potencial de producción son *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* y *B. mojavensis* (Gupta *et al.*, 2002b; Kalisz 1988; Kumar y Takagi 1999; Rao *et al.*, 1998).

Otras especies bacterianas conocidas como potenciales productores son las *Pseudomonas sp.* (Bayouhd *et al.*, 2000; Ogino *et al.*, 1999), entre los actinomicetos se encuentran las cepas de *Streptomyces* (Petinate *et al.*, 1999) y en hongos, *Aspergilli*, *Conidiobolus sp.*, y *Rhizopus sp.*, estas han sido utilizados para la producción de proteasas (Chakrabarti *et al.*, 2000; Rajamani y Hilda 1987; Bhosale *et al.*, 1995; Banerjee y Bhattacharyya, 1993), también la levadura *Candida sp.* ha sido estudiada como potencial fuente de proteasas alcalinas (Poza *et al.*, 2001). Un gran número de bacterias, hongos, levaduras y actinomicetos son conocidos por su capacidad de producir proteasas alcalinas de tipo serínico (Kumar y Takagi, 1999). Existe una lista amplia de microorganismos productores de proteasas, pero solo pocos son considerados apropiados para la explotación industrial,

debido a que entre otras características deben de estar ubicados en las listas internacionales de seguridad (GRAS), es decir que tienen las características de ser no-tóxicos y no-patógenos.

En cuanto a la obtención del producto, la estrategia convencional de purificación enzimática utilizada, involucra la concentración, cromatografía o sistemas de extracción de dos fases y la estrategia depende de la proteasa en cuestión. Varias proteasas industrialmente importantes han sido cristalizadas para estudios de homología molecular y estructuras tridimensionales (Gupta *et al.*, 2002a). Las proteasas alcalinas tienen su aplicación en la formulación de detergentes y éstas requieren de ser activas en intervalos de pH entre 8-12 y temperaturas entre 50-70 °C, algunas excepciones se pueden encontrar con pH hasta 13 y temperaturas de 80 °C. El punto isoeléctrico de las proteasas alcalinas se encuentra generalmente entre 8-11, las características enzimáticas requeridas por las industrias dependen del uso que estas realicen en el proceso o producto final deseado.

1.1. Microorganismos marinos como fuente de enzimas con actividades catalíticas novedosas

En el ambiente marino se encuentran millones de especies de microorganismos que realizan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica, degradación del plancton muerto, plantas, animales, compuestos contaminantes, así como en la productividad primaria y secundaria. Estos microorganismos tienen una diversidad de actividades enzimáticas y son capaces de catalizar reacciones bioquímicas con enzimas

novedosas de acuerdo al entorno en el que se desarrollan. Así bacterias aeróbicas pueden producir enzimas como amilasas, desoxiribonucleasas, lipasas y proteasas. Algunas especies han sido reportadas como productoras de cantidades considerables de alginato-liasa, quitinasas, glucanasas, glutaminasas, haloperoxidasa, ADN polimerasas y enzimas termo-estables (Austin, 1992; Chandrasekaran, 1997), obteniéndose enzimas con características no encontradas en microorganismos terrestres y que son de gran utilidad. Entre estos microorganismos se han encontrado microorganismos marinos como bacterias (Farell y Crosa, 1991), levaduras, hongos y cianobacterias de vida libre marina (Namikoshim y Rinehart, 1996) que son productores de enzimas proteolíticas. Algunos de estos microorganismos se encuentran asociados a organismos, ya sea que se encuentren presentes en los órganos digestivos de algunas especies marinas (Pinn *et al.*, 1997) o bien como simbioses externas (Farell y Crosa, 1991), estos microorganismos pueden ser utilizados por el sector industrial para producir enzimas con diferentes características catalíticas.

Los microorganismos mesófilos y psicrófilos del ambiente marino producen enzimas con actividades y estabilidades inusuales con respecto a las encontradas en el medio terrestre. Se ha observado que estas enzimas son reactivadas por la presencia de algunos iones como sodio y zinc (Farell y Crosa, 1991) calcio, magnesio, y cobalto (Duong *et al.*, 1981) por lo que estas enzimas presentan expectativas interesantes también en la aplicación como aditivos para detergentes y en donde la catálisis se realice a

temperaturas inferiores a los 25 °C debido a la naturaleza de estas enzimas (Manachini y Fortina, 1998).

El estudio de las proteasas de origen bacteriano marino es aún reciente y se ha centrado en la caracterización (mecanismo de acción) de enzimas proteolíticas y sus relaciones con especies de importancia comercial, como por ejemplo el camarón (Fukuda *et al.*, 1997) y el salmón (Ellis *et al.*, 1997; Farrell y Corsa 1991; Wiklund y Dalsgaard, 1998). A estas enzimas se les ha considerado como un factor importante de la patogenicidad de las bacterias (Ellis *et al.*, 1997; Farrell y Crosa, 1991; Moreno y Landgraf, 1998; Lygren *et al.*, 1998; Toranzo y Barja, 1993), o bien los estudios se han enfocado en aquellas enzimas que contribuyen a facilitar la digestión del alimento (Pinn *et al.*, 1997). También con estas enzimas se han realizado estudios de manipulación genética (Croxatto *et al.*, 2002; Durhan *et al.*, 1993) los cuales han contribuido al aumento de las aplicaciones de éstos. Pero poca información se ha encontrado sobre la utilización de éstas enzimas o como efectuar la producción a nivel planta piloto o gran escala, y esto en parte se debe a que la actividad enzimática no es expresada en crecimiento en bioreactor.

1.2. Desarrollo de un bioproceso de producción para un microorganismo marino

Los microorganismos que se encuentran en el mar requieren comúnmente en forma específica del ion sodio para la estabilidad de su membrana celular (Madigan *et al.*, 1999). Además de los iones potasio,

calcio y magnesio para su crecimiento y para la producción de la actividad enzimática (Makino *et al.*, 1981). Estos micronutrientes (iones) necesarios para el crecimiento de las bacterias marinas ya han sido considerados (Oppenheimer y Zobell, 1952), por lo que usualmente se utiliza agua de mar envejecida en la preparación de medios de cultivo marino sólido.

La mayoría de las enzimas microbianas de uso industrial son producidas por fermentación sumergida convencional, lo cual permite el control de las condiciones de producción, en comparación con fermentación en estado-sólido. El proceso de fermentación en estado líquido para la producción de proteasas, pareciera ser idéntico en todos los casos, es una necesidad real el optimizar los parámetros de operación, tales como, temperatura, pH, nutrientes, promotores, tiempo de incubación, preparación de inóculo, y el desarrollo del proceso de recuperación-purificación de la enzima deseada. Esto se debe principalmente a las variaciones en el desarrollo de las cepas microbianas y la naturaleza de la síntesis de la enzima. Los microorganismos marinos requieren en muchas ocasiones, condiciones especiales de cultivo, presión hidrostática y/o osmótica diferente, medios de cultivo diferentes, selección de modos de operación de la fermentación, requerimientos de oxígeno, estabilidad a la fuerza de corte ejercida por las condiciones hidrodinámicas de los bioreactores, especialmente agitación, que involucra el tipo de agitador (Chandrasekaran, 1997, Márquez, *et al.*, 1999).

Entre los factores importantes a desarrollar durante la primera etapa del proceso es la caracterización del crecimiento del microorganismo,

determinar los factores nutricionales, bioquímicos y fisicoquímicos, obtención del producto su calidad y estabilidad. En cuanto a la caracterización del crecimiento microbiano éste dependerá de la forma de utilización de los nutrientes del medio, el transporte de estos elementos a través de la membrana celular y la ruta metabólica que utilicen para su consumo. El rendimiento y la adquisición de un modelo de crecimiento y producción se utilizan para modelar el curso del proceso.

El diseño de una planta de bioproductos requiere del conocimiento de varias disciplinas destacando las de biociencias y de ingeniería. La integración de éstas disciplinas tiene un efecto sinérgico de la biotecnología industrial (Kevin y Hatzimanikatis, 2002). La estructura conceptual de un bioproceso inicia con el estudio del organismo que se va a utilizar, desarrollo del medio de cultivo, optimización de éste y las condiciones del mismo cultivo, cinética de crecimiento, producción de metabolitos, diseño del biorreactor y del proceso de recuperación y por último purificación del producto deseado y modelación. Una vez realizado lo anterior, se procede a la realización del escalamiento del proceso aunado al estudio de factibilidad económica del mismo. Los principales criterios de escalamiento están relacionados a uno de los factores más importantes la transferencia de oxígeno y de nutrientes.

1.3. Transferencia de oxígeno en bioreactor

La oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células productos y CO_2 , establece una demanda de oxígeno que es esencial

satisfacer a través de la aireación y mezclado del cultivo. La determinación de los requerimientos de oxígeno del cultivo es un factor indispensable para asegurarse de que el suministro sea suficiente. El oxígeno debe de ser aportado continuamente ya que es sólo escasamente soluble en una solución acuosa (Cliffe K. 1996). Cuando se evalúa la transferencia de oxígeno en una fermentación es necesario calcular las resistencias a la transferencia que encuentra el oxígeno antes de llegar a la célula. El mecanismo total de la transferencia se puede dividir en una serie de pasos de la manera siguiente: primeramente el oxígeno debe viajar a través del gas hacia la interfase gas-líquido, después a través de la interfase del líquido y finalmente, hacia el organismo. El proceso completo es impulsado por la diferencia entre la concentración de oxígeno en el gas y en el organismo. Se ha encontrado que la rapidez de transferencia de oxígeno a bajas concentraciones, es proporcional a la diferencia de concentraciones del mismo (Cliffe, 1996). Se ha demostrado que la resistencia mayor la opone la película de líquido que rodea las burbujas. Pero esto sólo ocurre en el caso de organismos unicelulares. En los agregados celulares (pellets) la difusión a través del agregado mismo constituye el paso limitante (Miura, 1976).

En el caso de absorción de gases en líquidos mediante burbujeo de gas, la resistencia total está representada por la película del líquido. La concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido es casi igual a su solubilidad, C_g^* , y C_L es la concentración de oxígeno en el seno de la solución. Es posible por lo tanto, tener un coeficiente de transferencia de oxígeno $k_L a$ en la fase líquida y un área interfacial. El término $k_L a$ depende

de las propiedades físico-químicas del medio en bioreactor y sus condiciones de operación. El valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_{L,a}$, puede ser controlado por las condiciones de agitación y el flujo de aire. Se han creado numerosas técnicas para la determinación experimental de los valores de $k_{L,a}$. La técnica más directa es la del régimen estacionario (Wang *et al.*, 1979) en el cual se utilizan las mediciones de las concentraciones de oxígeno gaseoso de entrada y salida y los flujos, para determinar la rapidez de captación de oxígeno. Se usa un electrodo de oxígeno disuelto para medir la concentración de oxígeno en el líquido. El oxígeno es un sustrato que limita el crecimiento, sin embargo arriba de cierta concentración de células, el crecimiento dependerá de la concentración de oxígeno. El conocimiento del comportamiento de $k_{L,a}$ permite la operación de los bioreactores en condiciones en las cuales el oxígeno no es un factor limitante para el crecimiento.

2 ANTECEDENTES

La producción industrial de enzimas utilizando microorganismos marinos es escasa y existen pocos reportes que describan el uso de biorreactores para este propósito. Actualmente, algunos investigadores están trabajando en la optimización de la producción de algunas proteasas para aplicaciones en biomedicina y alimentos, producidas a partir de un *Vibrio costícola* y de *Pseudomona fluorescens* y de quitinasas producidas por *Pseudomonas pseudomallei* y *Streptoverticillium* sp., utilizando procesos de fermentación en estado sólido y sumergido respectivamente (Chandrasekaran, 1997)

2.1. Bacterias marinas productoras de enzimas proteolíticas con propiedades novedosas

Diversos estudios demuestran la posibilidad de obtener enzimas proteolíticas con propiedades catalíticas novedosas a partir de bacterias marinas. Se han obtenido proteasas endo- y exopeptidasas de *Vibrio* sp. (Wiersma *et al.*, 1978), de otras proteasas también se han reportado en *Vibrio* sp. (Ichige *et al.*, 1988; David *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 1992), *Vibrio proteoliticus* (Durham *et al.*, 1993), *Aeromonas salmonicida* sp. (Lygren *et al.*, 1998). *Aeromonas subtilasa* (Tsujiho *et al.*, 1996), Algunas otras cepas marinas producen proteasas alcalinas sensibles a quelantes de metales (Fukasawa *et al.* 1998) y *Vibrio harveyi* (Liu *et al.*, 1999).

Vibrio harveyi es una bacteria luminiscente ubicua que se encuentra en aguas marinas, como parte de la flora intestinal de algunos animales marinos (Harris *et al.*, 1996), pero también puede encontrarse en forma libre, saprofílica, en simbiosis y como parásito (Jayabalan y Pillai 1994). El peso molecular es un factor importante para la recuperación de las enzimas en los procesos industriales, siendo una de las características enzimáticas primordiales a determinar. En el género *Vibrio* dos proteasas de pesos moleculares de 22 y 38 kDa fueron purificadas y parcialmente caracterizadas en las cepas 770527 y 820514 (Lee *et al.*, 1999, Liu y Lee 1999). Se reportó una proteasa cisteínica de 22 kDa en *Vibrio harveyi* (Lee *et al.*, 1997) una endopeptidasa de 31 kDa y una aminopeptidasa de 21 kDa en *Vibrio sp.*, con un pH óptimo entre 7.8–8.6 y una temperatura óptima de actividad de 50-65 °C (Wiersma *et al.*, 1978), en *Vibrio anguillarum* se reportó una proteasa de un peso molecular de 38 kDa, la cual fue inhibida por EDTA (Farell y Crosa, 1991), y de otro *Vibrio sp.* se ha reportado una proteasa de 94 kDa (Ichige *et al.*, 1988), en *Aeromonas salmonicida* una proteasa extracelular de 70 kDa (Ellis *et al.*, 1997), otra del mismo peso producida en la fase exponencial (Lygren *et al.*, 1998), una aminopeptidasa para alanina (Obata *et al.*, 1997) y dos metalo-endopeptidasas en el intestino de *Paraoeneus trisfasciatus* con pesos moleculares de 48 y 36 kDa (Fukuda *et al.*, 1997).

La cepa *Vibrio harveyi* FLA-11 produce enzimas sensibles a agentes quelantes, con características de proteasas alcalinas (Fukasawa *et al.*, 1988). En estas enzimas, el inhibidor PMSF no presentó efecto inhibitorio

sobre la actividad enzimática, concluyendo estos autores que el mecanismo no es de tipo serínico. El peso molecular de la enzima encontrada corresponde a 21 kDa (Fukusawa *et al.*, 1988). De otra cepa de *Vibrio harveyi* 820514 fue realizada la purificación y caracterización de la misma, basándose en estudios enzimáticos de inhibición, concluyendo que se trata de una "cistein-proteasa". Esta caracterización fue basada en estudios enzimáticos utilizando inhibidores específicos. La proteasa fue inhibida por iones (Cd^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Hg^{+2}) y mostró una sola banda electroforética con un peso molecular de 38 kDa, (Lee *et al.* 1999), en esta especie se ha encontrado otra actividad de 22 kDa de peso molecular (Liu y Lee 1999). En todos estos estudios se determinó la actividad utilizando inhibidores específicos y no utilizaron sustratos específicos para la actividad reportada.

2.2. Condiciones de cultivo para la producción de proteasas

En un cultivo sumergido, una cepa bacteriana excretó una metaloproteasa con una actividad enzimáticamente óptima entre 20–30 °C y un pH de 6.5–7.0 (Turkiewicz *et al.*, 1999), *Vibrio anguillarum*, crecido en Luria-Bertani, excretó una proteasa (Denkin *et al.*, 1999). Una *Pseudomona sp* 145-2, que puede crecer entre 0-37 °C y produjo una proteasa entre las 6-10 horas de cultivo a una temperatura entre 20-30 °C (Makino *et al.*, 1981). Algunas de estas bacterias pueden crecer en agar infusión de cerebro y corazón, agar soya tripticasa suplementados con NaCl 1.5 % (Lee *et al.*, 1997) o bien en agar marino. Las bacterias psicrófilas (*Vibrio sp.* OP7) aisladas de peces marinos (Makarios-Laham, 1990) presentaron una

temperatura máxima de crecimiento a los 16 °C en un medio mineral con extracto de levadura y NaCl.

Una cepa bacteriana marina aislada de un eufáusido del Antártico produjo y excretó una metaloproteasa entre 5 – 10 °C. La temperatura óptima de crecimiento fue a los 15 °C, y la máxima actividad proteolítica se detectó entre los 20 y 30 °C, el pH óptimo fue de 6.5-7.0 (Turkiewicz *et al.*, 1999). Una *Pseudomonas* sp. 145-2 aislada del mar de Uwa, Japón (Makino *et al.*, 1981) puede crecer en un intervalo de temperatura de 0 a 37 °C, con producción enzimática entre las 6 a 10 horas de cultivo, entre 20 y 30 °C. Estos autores utilizaron caseína como fuente de carbono y nitrógeno, observando que para el crecimiento y producción de proteasas fue necesaria la adición de los iones sodio, potasio, calcio y magnesio. Otras proteasa obtenidas de *Pseudomonas* han sido purificadas y caracterizadas (Duong *et al.*, 1981; Takenaka y Watanabe, 1997).

Bacterias termófilas como *Pyrococcus abyssi* y *Pyrococcus fuciosus* secretan proteasas extracelulares (Dib *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 1997), cuya temperatura óptima de actividad puede ser cercana a los 100 °C. Otras cepas halotolerantes de *Bacillus licheniformis* aisladas del sedimento marino, han demostrando ser capaces de producir una gran actividad proteolítica durante la fase exponencial tardía de crecimiento y se ha observado que al utilizar agua de mar durante la fermentación incrementó la producción enzimática a 150% (Manachini y Fortina 1998). Kohlmann *et al.*, (1991), encontraron producción de proteasas en dos cepas psicrófilas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. fragi*, en medio nutritivo a 7 °C. La mayor

producción se observó en la parte tardía de la fase exponencial y la fase temprana de la fase estacionaria. La actividad proteolítica encontrada es estable entre 7- 52 °C y 5.5-8.5 de pH, ésta enzima fue inhibida por el EDTA reportándose como una metaloproteasa. Una “serin-proteasa” fue obtenida por una arqueo-bacteria haloalcalofílica *Natrialba magadii* al término de la fase exponencial del crecimiento microbiano, cuya acumulación siguió a lo largo de la fase estacionaria. Esta bacteria puede crecer a pH entre 8.5-11 y una concentración de NaCl de 20 % (Giménez, *et al.*, 2000).

2.3. Parámetros operacionales de biorreactores

Las características operacionales tienen importancia fundamental en procesos biotecnológicos industriales, uno de los costos importantes de la fermentación industrial son las propiedades hidrodinámicas del bioreactor, que en el mejor de los casos deben de ser óptimas. La producción de proteasas extracelulares por *Bacillus subtilis* puede ser mejorada significativamente, modificando elementos operacionales como: el tipo de impulsor, velocidad de agitación y aireación, modificando la relación altura-diámetro del reactor, para el caso de un bioreactor tipo “air-lift” el cambio en la relación altura-volumen produjo un aumento del 10 % en la producción de proteasa, aun habiendo sido optimizada la producción en un reactor agitado con propelas (Yuguo Z. *et al.*, 2001).

El control de la tensión de oxígeno disuelto en fermentaciones bacterianas involucra la manipulación de la velocidad de agitación y la velocidad de suministro de aire, para ello optimizar el coeficiente volumétrico

de transferencia de masa kLa es importante. Este recurso da resultados satisfactorios debido a que el coeficiente de transferencia de masa kLa es una función del poder de disipación proporcionado por la propela por unidad de volumen. La concentración de oxígeno disuelto puede ser controlada por la manipulación de la presión parcial de oxígeno en la fase líquida y manteniendo el flujo de aire y la agitación constante en el biorreactor (Simon y Karim 2001).

La salinidad del caldo de cultivo, la velocidad de aireación y agitación, tienen un efecto directo en la transferencia de oxígeno, el grado de turbulencia, la velocidad de circulación del caldo e influyen sobre la concentración de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de la enzima (Popovic et al., 1979).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos marinos poseen gran potencial para la producción de metabolitos secundarios y enzimas por la gran diversidad que en ellos existe. Sin embargo, son pocos los estudios que se enfocan en la caracterización detallada de las etapas del crecimiento bacteriano y la formación de producto, desarrollo del medio de cultivo y aún más escasos son los trabajos para desarrollar procesos de fermentación en un biorreactor. Lo anterior implica no sólo el estudio de las características fisiológicas mismas del microorganismo sino también de la operación e hidrodinámica del reactor. El presente trabajo describe la producción de proteasas por algunas especies marinas del género *Vibrio*, la caracterización enzimática de

las proteasas producidas por *Vibrio harveyi* y el efecto de las condiciones hidrodinámicas del bioreactor sobre el crecimiento y la producción de proteasas.

JUSTIFICACION

Se tiene una gran cantidad de información de las características bioquímicas de proteasas producidas por microorganismos marinos, especialmente de bacterias, con la cual se demuestra el gran potencial para su uso a nivel industrial. Sin embargo, para que algún microorganismo pueda ser utilizado industrialmente se requiere el desarrollo de un bioproceso de producción para la optimización del rendimiento del producto y la factibilidad económica. Para llevar a cabo esto es necesario el desarrollo del medio de cultivo adecuado y la optimización de las condiciones operacionales del cultivo a nivel "reactor-bench" y así obtener los criterios de escalamiento. Para el caso de bacterias marinas no existe literatura disponible al respecto, y no hay evidencias de que estos organismos se puedan desarrollar en bioreactor y produzcan enzimas a este nivel.

OBJETIVO

El objetivo es desarrollar un proceso de producción de proteasas, modificando las condiciones hidrodinámicas en un bioreactor utilizando bacterias marinas y la caracterización de las proteasas extracelulares que estas bacterias producen.

Objetivos particulares

- Caracterizar la producción de proteasas en medio líquido de algunas cepas del género *Vibrio*
- Determinar el principal mecanismo de acción de las enzimas proteolíticas y sus características enzimáticas
- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas utilizando diferentes condiciones en un bioreactor.

III MATERIALES Y METODOS

Estrategia experimental

Este trabajo fue realizado a través de las siguientes etapas:

1. Selección de las cepas productoras de proteasas
 - a) escrutinio de cepas ATCC del género *Vibrio*
 - b) aislamiento de una cepa nativa del mismo género
2. Características del crecimiento bacteriano
 - a) Selección del medio de cultivo.
 - b) Caracterización de la producción de proteasas
 - b) Bioluminiscencia
3. Caracterización y purificación de proteasas
 - a) Purificación
 - b) Caracterización enzimática
4. Crecimiento bacteriano y producción de proteasas en bioreactor
 - a) Propiedades hidrodinámicas del bioreactor. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno, efecto de la aireación y de la agitación.
 - b) Cinética de crecimiento

REACTIVOS

Los medios de cultivo e ingredientes bacteriológicos utilizados en este trabajo fueron marca Difco (Sparks, MS, USA). Los reactivos en general, así como los substratos e inhibidores fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Co., St. Louis, Mo, USA). Para electroforesis se usaron reactivos de Biorad (Richmond, CA. USA).

Medio de cultivo y cepas bacterianas

Las cepas utilizadas fueron: *V. harveyi* 14126 (clasificada como un microorganismo de bio-seguridad nivel 1). *Vibrio holisae* 35564, *V. damsela* 33539, *V. ordalli* 33509, y *V. fishery* 7744, todas ellas de la colección del ATCC (American Type Culture Cell), excepto *Vibrio* sp., que fue aislada del medio marino (homogenización en agua de mar 75 %, playa Wakiki, Oahu, Hawai, USA). Las cepas fueron resembradas en agar marino, a una temperatura de 30 °C y conservadas a -70 °C en glicerol 30 %. Los medios usados para crecimiento fueron Zobell (Z) y Zobell suplementado con "skim milk" (ZSM), preparado en agua de mar (filtrada 0.2 µm, añejada, salinidad 26 %).

3.1. Identificación de cepas productoras de proteasas extracelulares

Se utilizó el medio Zobell con "skim milk", en el cual se sembraron las cepas a estudiar cultivándose 24-48 h, a una temperatura de 30 °C. Las cepas productoras se identificaron con la aparición de una zona clara alrededor de las colonias, tal como lo describe Sizemore y Stevenson

(1970). Posterior a esta identificación se propagaron estas en medios líquidos para determinar la actividad extracelular en el extracto crudo del cultivo.

3.2. Características de crecimiento en medio líquido de las cepas del genero *Vibrio*.

En este ensayo se utilizaron los medios Z y ZSM el volumen de operación fue de 500 mL en un matraz Erlenmeyer de 1 L. El procedimiento de inoculación fue el mismo que para el bioreactor, las mediciones se realizaron por duplicado.

3.2.1. Determinación del crecimiento bacteriano y análisis cinético

Para el análisis cinético la curva de crecimiento fue definida como el logaritmo del tamaño de la biomasa [$y = \ln (X/X_0)$] en función del tiempo (t), μ determinada utilizando un modelo Gompertz:

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu}{A} (\lambda - t) - 1 \right] \right\},$$

donde μ es la tasa específica de crecimiento, λ el tiempo lag y la asíntota A.

3.2.2. Determinación de la bioluminiscencia en medio líquido

En forma paralela a la determinación del crecimiento, se determinó la intensidad bioluminiscente que emitió un mL del cultivo, utilizando un luminómetro marca Emlite (Ilyina *et al.*, 1998). Para la medición de la intensidad luminiscente el equipo esta provisto de dos formas de detección,

midiendo continuamente o bien midiendo las intensidades máximas registradas. Para este caso se utilizó la máxima lectura detectada. Para obtener la lectura máxima se realizó una agitación intensa del cultivo en un tubo eppendorf con ayuda de una pipeta y equipo vórtex, y se colocó dentro del luminómetro, el cual estaba provisto de celdas especiales para este objetivo. Esta lectura se obtuvo sin la adición de activadores de la bioluminiscencia y sin la precipitación de células, lectura inmediata. La verificación de la bioluminiscencia se realizó utilizando un espectrofluorómetro marca Shimatzu sin la adición de activadores o bombardeo de electrones obteniéndose los espectros correspondientes.

3.3. Purificación y caracterización de enzimas

3.3.1. Preparación del extracto

Del caldo de cultivo se tomaron alícuotas de 3 mL cada hora las cuales fueron centrifugadas a 16,000 x g por 5 min, y se recuperó el sobrenadante, el cual sirvió como extracto crudo para determinar la actividad proteolítica. Otro mL se utilizó para el monitoreo de bioluminiscencia. El sobrenadante fue separado y congelado a una temperatura de -70 °C, con ayuda de un ultracongelador. Para concentrar el sobrenadante fue liofilizado utilizando las condiciones del equipo de liofilización LABCONO (-53°C y 14×10^{-3} lb de presión). El liofilizado fue resuspendido en agua desionizada y fue dializado contra agua destilada. Terminado el proceso de diálisis se realizó la ultrafiltración de las muestras. Para realizar la ultrafiltración se realizó en un equipo Supelco provisto de una membrana con tamaño de

exclusión molecular de 10 kDa. La presión suministrada para la realización de la ultrafiltración fue de 50 a 60 psi de aire comprimido, por un lapso de 6 horas y la muestra se mantuvo a 4 °C. Al terminar de concentrar el sobrenadante, el interior del cilindro se recuperó y fue utilizado en el siguiente paso de purificación. Para la realización de la separación proteica se utilizó DEAE, celulosa (sigma) la cual se preparó, activó y equilibró previamente a su utilización. Para la separación de proteínas se utilizó una columna marca Supelco de 28 cm de largo y con un diámetro de 1 cm. Para la elusión de proteínas presentes en la muestra se utilizó un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 0.5 M, en el mismo amortiguador. Se recolectaron fracciones de 4 mL. De cada una de las fracciones obtenidas se determinó la proteína por espectrofotometría a 280/260 nm y en las muestras donde se observó una mayor absorbancia se cuantificó proteína y actividad enzimática con ayuda de zimogramas. De esta fracción proteica se realizaron los siguientes estudios.

3.3.2. Caracterización de enzimas

3.3.2.1. Actividad proteolítica utilizando azocaseína

La actividad proteolítica total se determinó basándose en el procedimiento descrito por los autores García-Carreño *et al*, (1993) y Kohlmann *et al*, (1991). Brevemente: La mezcla de reacción fue de 1 mL, en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, utilizando como sustrato azocaseína al 1%. La reacción se llevó a cabo a una 37 °C por 10 min., para iniciar la reacción se agrego 1.7 µg de proteína del extracto crudo. La reacción fue detenida por la

adición de 0.5 mL de TCA al 20 % (p/v), manteniéndose 10 min a 4 °C, la reacción se centrifugó a 14,000xg por 5 minutos. El sobrenadante se leyó a 366 nm, utilizando agua como blanco y controles negativos. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir el incremento de absorbancia a una unidad a 366 nm por un min. El ensayo fue realizado por duplicado y la actividad fue calculada como sigue:

$$UA = \frac{\Delta A / \text{min}}{\text{mg proteina}}$$

UA= unidad de actividad ΔA = cambio de absorbancia

3.3.2.2. Sustratos utilizados en la determinación de actividad proteolítica

Se evaluaron las actividades de Carboxipeptidasa A y B, y Aminopeptidasas (García-Carreño *et al.*, 1994) a 1.2 mM de sustrato disuelto en Tris-HCl 50 mM pH 7.2, actividad tipo amidasa (enzimas tipo tripsina y afines) se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961), utilizando el valor del coeficiente de extinción molar de 8800 cm⁻¹ M⁻¹ de acuerdo a Dimes *et al.*, (1994). La actividad tipo quimiotripsina se determinó utilizando dos sustratos específicos el Suc-AAPF-Na y BTEE (García-Carreño *et al.*, 1994), con algunas modificaciones: El ensayo fue realizado a 37 °C a una concentración de sustrato 0.25 mM disuelto en 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.8 conteniendo 10 mM de CaCl₂ en la reacción. La liberación de *p*-nitroanilida fue monitoreada por incremento de absorbancia a

410 nm ($\epsilon_{410} = 8800 \text{ M}^{-1}$). La absorbancia se registró a intervalos de tres segundos durante cinco minutos. Una unidad de actividad fue definida como:

$$UA = \frac{(\Delta A_{410} \text{ min}^{-1})(1000 \text{ mL})(\text{vol de reacción en mL})}{(8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})(\text{mg proteína})}$$

3.3.2.3. Determinación de proteína

La determinación de proteína soluble se realizó utilizando el reactivo de BioRad, basada en el método de Bradford (1976).

3.3.2.4. Determinación de bandas de actividad y peso molecular por tinción con azul de Coomassie y zimogramas

Se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida 12 % (Laemmli *et al.*, 1970) con 0.1 % SDS (García-Carreño 1997). La cantidad de proteína fue de 1.7 μg o bien 0.4 UA en cada carril según el caso. Como marcador de peso molecular se utilizó un kit preteñido marca Bio-Rad, con un intervalo de peso molecular de 7 a 118 kDa. Para la tinción de las bandas de proteína el gel fue sumergido por 30 min en azul de Coomassie R-250 en etanol 0.1 %, ácido acético, agua 40:10:50, el gel fue suavemente agitado.

Para teñir geles con nitrato de plata, este fue fijado en MeOH 50 % y 5 % de ácido acético por 20 min. El gel se lavo con MeOH 50 % por 10 min y 10 min mas con agua desionizada. Se agregó tiosulfito de sodio 0.2 % por 1 min, dos lavados con agua desionizada por 1 minuto. Al gel se le agregó una solución de AgNO_3 1 % y se mantuvo a 4 °C por 20 min, sin agitación y en completa oscuridad. Se lavó en dos ocasiones con agua desionizada. Se

agregaron 216 μL de formaldehído al 37 % a 50 mL de una solución de Na_2CO_3 al 2 %, esta mezcla se adicionó al gel. Se retiró la solución y se fijó con una solución al 5 % de ácido acético.

La tinción para los zimogramas se realizó de acuerdo a Rosenberg (1996). Brevemente: después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada. Se colocó en un recipiente de plástico y se sumergió con una solución a 4 °C de caseína al 2 % previamente disuelta en su totalidad en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (50mL), durante 30 min. Posteriormente, se incubó por 90 min a 37 °C. El gel se lavó con agua destilada tres veces. El gel se sumergió en 50 mL de una solución de tinte (etanol 40 %, ácido acético 10 %, azul de Coomassie R-250 al 0.1 %, solución fue filtrada con papel Whatman #1) por 2 horas con una agitación de 30 rpm. El gel se con agua corriente seguido de enjuagues con agua destilada y se sumergió en una solución para desteñirlo.

3.3.2.5. Caracterización proteolítica utilizando inhibidores en zimogramas

Una alícuota del dializado de etapas anteriores fue incubada en presencia de cada uno de los siguientes inhibidores: TLCK; Pestatin; Bestatin; EGTA; EDTA; PMSF; TPCK; ZPCK; SDS; y de iones metálicos: CdCl_2 ; CuCl_2 , HgCl_2 y ZnCl_2 durante una hora y posteriormente se realizó la electroforesis y revelado del zimograma. Estos procedimientos se encuentran descritos en Beynon y Bond (2001).

3.3.2.6. Análisis del gel

Las imágenes de los zimogramas y geles de SDS-Page revelados con azul de Coomassie y nitrato de plata, fueron digitalizados con un scanner Hewlett Packard 6900. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Quantity One (Biorad). Se determinó el peso molecular mediante la gráfica semilogarítmica de la relación de migración de las bandas en el gel (Rf) versus el log del peso molecular. Se usaron marcadores de peso molecular (BioRad), No. catálogo 161-0372, 1610318

3.3.2.7. Efecto de inhibidores y algunos iones sobre la actividad enzimática.

El extracto crudo fue liofilizado, resuspendido en agua destilada, dializado contra agua desionizada, utilizando una membrana con un corte molecular de 14 kDa. El concentrado obtenido fue incubado en presencia de cada uno de los siguientes inhibidores: TLCK; EGTA; EDTA; PMSF; SDS (García-Careño y Haard, 1993); Bestatin; Pestatin; ZPCK; TPCK; y de iones metálicos: CdCl₂; CuCl₂, HgCl₂ y ZnCl₂. La concentración de cada uno de los inhibidores utilizados se basaron en los protocolos descritos en Beynon y Bond (2001). Una vez terminado el tiempo de incubación (30 min) se determinó la actividad proteolítica.

3.3.2.8. Determinación del efecto del cloruro de sodio.

Se determinó el efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre la actividad proteolítica utilizando diferentes concentraciones en el ensayo de

determinación de actividad utilizando azocaseína en un intervalo de concentración de 0 a 2.25 M.

3.3.2.9. Energía de activación-inactivación

Para determinar la energía de activación se utilizó la ecuación de Arrhenius:

$$\log K = \frac{\log A - E_a}{2.3 \times RT}$$

donde: k; es la constante de reacción a una temperatura dada. A; Constante de Arrhenius T; es la temperatura en °K y R; es la constante de los gases (8.31 Joules °K⁻¹ mol⁻¹). El logaritmo de la actividad específica (k) fue graficada contra el recíproco de la temperatura absoluta. La pendiente será (-E_a/R). Para la obtención de esta energía se utilizaron los datos de temperaturas inferiores a la máxima actividad.

3.3.2.10. Determinación de la estabilidad de la enzima a la temperatura

La determinación de la temperatura óptima para el desarrollo de la actividad quimiotripsina se llevó a cabo variando la temperatura de incubación en rangos de 10 °C y con el margen de temperatura de 25 hasta 90 °C.

Para la determinación de la estabilidad del extracto crudo ante diferentes temperaturas, éste fue incubado durante 30 minutos y después de este tiempo se mantuvo cinco minutos a 4 °C. Posteriormente se les determinó la actividad. La actividad quimiotripsina usada como control (100 % actividad relativa) fue la actividad que expresó el extracto que fue incubado a 4 °C y que no fue incubado a otras temperaturas.

3.3.2.11. Efecto del pH

El efecto del pH se determinó utilizando Tris-HCl 50 mM en un intervalo de pH entre 7-10, conteniendo 0.25 mM de SUC-AAPF-NA (García-Carreño *et al.*, 1994).

3.4. Crecimiento de *Vibrio harveyi* en el bioreactor

3.4.1. Preparación del inóculo.

Una colonia de *V. harveyi* fue crecida por 24 h en agar marino y una asada inoculada en un matraz Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de medio Zobell, el cual fue incubado a 30 °C a 300 rpm en un agitador orbital por 4 h. Cinco mL de este caldo fueron inoculados en un matraz Erlenmeyer de 100-mL con 50 mL de medio Zobell. El cultivo se dejó crecer hasta una OD_{600nm} de 2.0. Dos matraces fueron utilizados como inóculo del bioreactor con 1 L de volumen de trabajo.

3.4.2. Descripción del bioreactor y condiciones del cultivo

El fermentador fue tipo Jar de 1.5 L (Applikon, Holland) con 1 litro de volumen de trabajo, el cual fue operado bajo un régimen en lote. El fermentador utilizado contaba con las siguientes características técnicas: dos turbinas de disco tipo Rushton (4.5 cm de diámetro), separadas 2.5 cm de la base del vaso, 11.44 cm desde la tapa, y 4.0 cm entre ellas. El fermentador está provisto de dos baffles (10 cm de largo y 1 cm de ancho), separados por 5.4 cm (Fig 1). El aire es suministrado a través de un tubo metálico con siete perforaciones de 0.9 mm de diámetro, los cuales están a una distancia

de 2.0 cm de la base, justo a 0.5 cm debajo de la turbina Rushton, para tener una dispersión de las burbujas de aire en un reactor homogéneo.

Las condiciones de cultivo fueron: la temperatura del reactor se mantuvo a 30 °C con ayuda de un baño de temperatura constante. El medio de cultivo tenía un pH inicial de 7.2 ± 0.1 . La formación de espuma fue controlada por la mínima adición de aceite vegetal estéril. Se emplearon dos medios de cultivo, el medio Z y el medio ZSM. Se monitoreó durante cada hora por un lapso de 8 horas: densidad óptica, pH, actividad enzimática y bioluminiscente para cada uno de ellos.

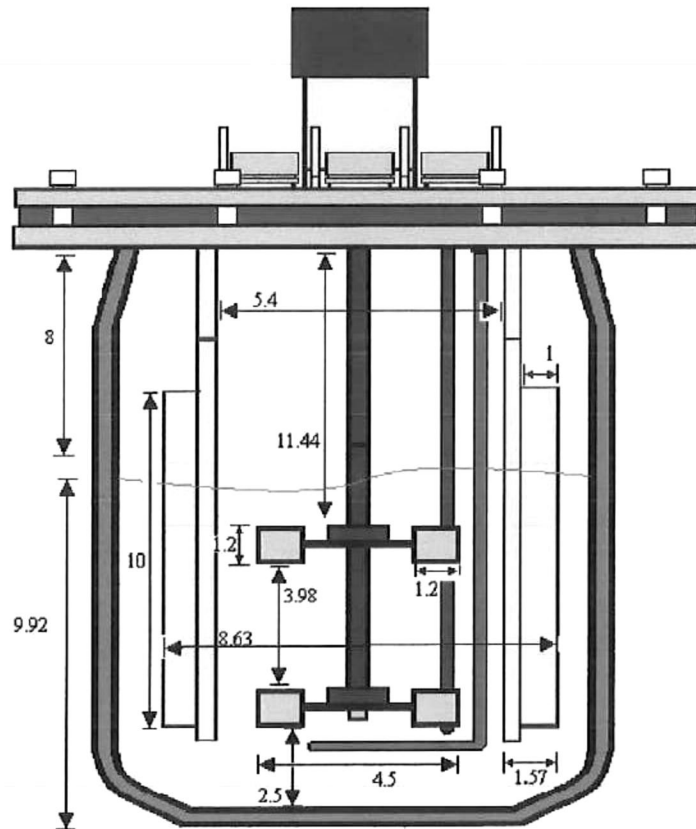


Figura 1. Descripción de las medidas del fermentador (Applikon, Holland) medidas en cm.

3.4.3. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de proteasas

El efecto del medio de cultivo sobre la actividad enzimática se evaluó previamente a nivel matraz; sin embargo, se realizó este estudio en el fermentador. Se monitoreo la densidad óptica para cada uno de los medios empleados utilizando las mismas condiciones de cultivo. Las condiciones de operación en las que se comparó este efecto fue una velocidad de agitación de 700 rpm y una velocidad de aireación de 0.8 vvm, aunque se realizaron las condiciones de 500 y 300 rpm con aireaciones de 0.2 y 0.5 vvm, es decir una velocidad con cada uno de los suministros de aire. Se determinó el comportamiento de la biomasa utilizado $\ln(X/X_0)$ de la biomasa monitoreando absorbancia y convirtiendo en peso seco utilizando la relación de biomasa - peso seco. Para cada una de las condiciones se determinó proteína y actividad proteolítica en el extracto crudo.

3.4.4. Coeficiente de conversión de densidad óptica a peso de biomasa seca.

Para obtener el peso seco de cada una de las muestras, éstas fueron filtradas a través de papel filtro de $0.2 \mu\text{m}$ y una vez filtrada la muestra se adicionó agua destilada y se filtró también, con el propósito de lavar los restos de medio de cultivo. Los filtros fueron colocados en una mufla a 105°C durante 6 horas. Estas determinaciones se realizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se obtuvo una línea recta y esta se utilizó para relacionar la concentración de biomasa en peso seco con la absorbancia a 600 nm.

3.4.5. Efecto del grado de agitación y aireación sobre el cultivo de *Vibrio harveyi*

Para evaluar el efecto del grado de agitación y aireación sobre la producción de enzimas y la producción de biomasa. Se utilizaron las velocidades de agitación: 300, 500, y 700 rpm y para cada una de ellas se utilizaron los flujos de aire de 0.2, 0.5 y 0.8 vvm. Cada una de estas condiciones se realizó para los dos medios de cultivo. Se determinó la absorbancia a 600 nm, así como la actividad proteolítica. Después de monitorear la biomasa y dibujar la curva se determina la tasa específica de crecimiento μ . El cambio de flujos de aire fue suministrado utilizando un medidor de flujo Barnstead, el cual es alimentado con una pequeña bomba de aire. Los flujos de aire fueron verificados utilizando un sistema de desplazamiento de volumen de agua en donde el flujo de aire es igual al volumen de agua desplazado.

3.4.6. Determinación del coeficiente de transferencia de masa kLa

La medición del kLa fue realizada mediante una técnica dinámica descrita por Wang *et al.*, (1979). Brevemente, la concentración de oxígeno disuelto presente dentro del fermentador se monitoreo constantemente y se llevó a cero, utilizando nitrógeno gaseoso. La concentración de oxígeno se midió utilizando un electrodo para medición de oxígeno exclusivo para fermentadores. La medición de oxígeno se realizó durante un periodo de 15 min con intervalos de 0.15 min hasta la obtención de la máxima saturación

de oxígeno. Las mediciones se realizaron variando la velocidad de agitación: 300, 500 y 700 rpm y utilizando diferentes flujos de aire 0.2, 0.5 y 0.8 vvm.

Para la determinación de oxígeno disuelto se utilizó un detector de oxígeno, de un fermentador NewBuinswik Bioflo 2000. Este detector se calibró con agua destilada saturada con un flujo de aire de 1.5 v.v.m. durante 8 horas. Correspondiendo a su saturación (7 mg/L), y para la calibración a 0 mg/L se utilizó un flujo de 0.2 vvm de nitrógeno gaseoso durante 30 minutos, o bien hasta que la lectura de concentración en el equipo indicó estabilidad de la lectura y una lectura aproximada de 0.01, posteriormente se ajustó ésta a 0. Para el agua de mar 6.7 mg/L. La determinación de oxígeno disuelto fue monitoreada hasta las máximas concentraciones de oxígeno, correspondientes a su saturación, utilizando el agua destilada y el agua de mar.

3.4.7. Producción extracelular de proteasas

En esta etapa del trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción de enzimas. Para ello se determinó la actividad proteolítica en el sobrenadante durante el curso de cada una de las fermentaciones, a intervalos de 1 hora y utilizando la azocaseína como sustrato. El monitoreo de la excreción de actividad se realizó en un lapso de 9 horas, las muestras del cultivo fueron centrifugadas, para la obtención de extracto crudo. Una vez obtenido el extracto crudo fue preservado a -70 °C.

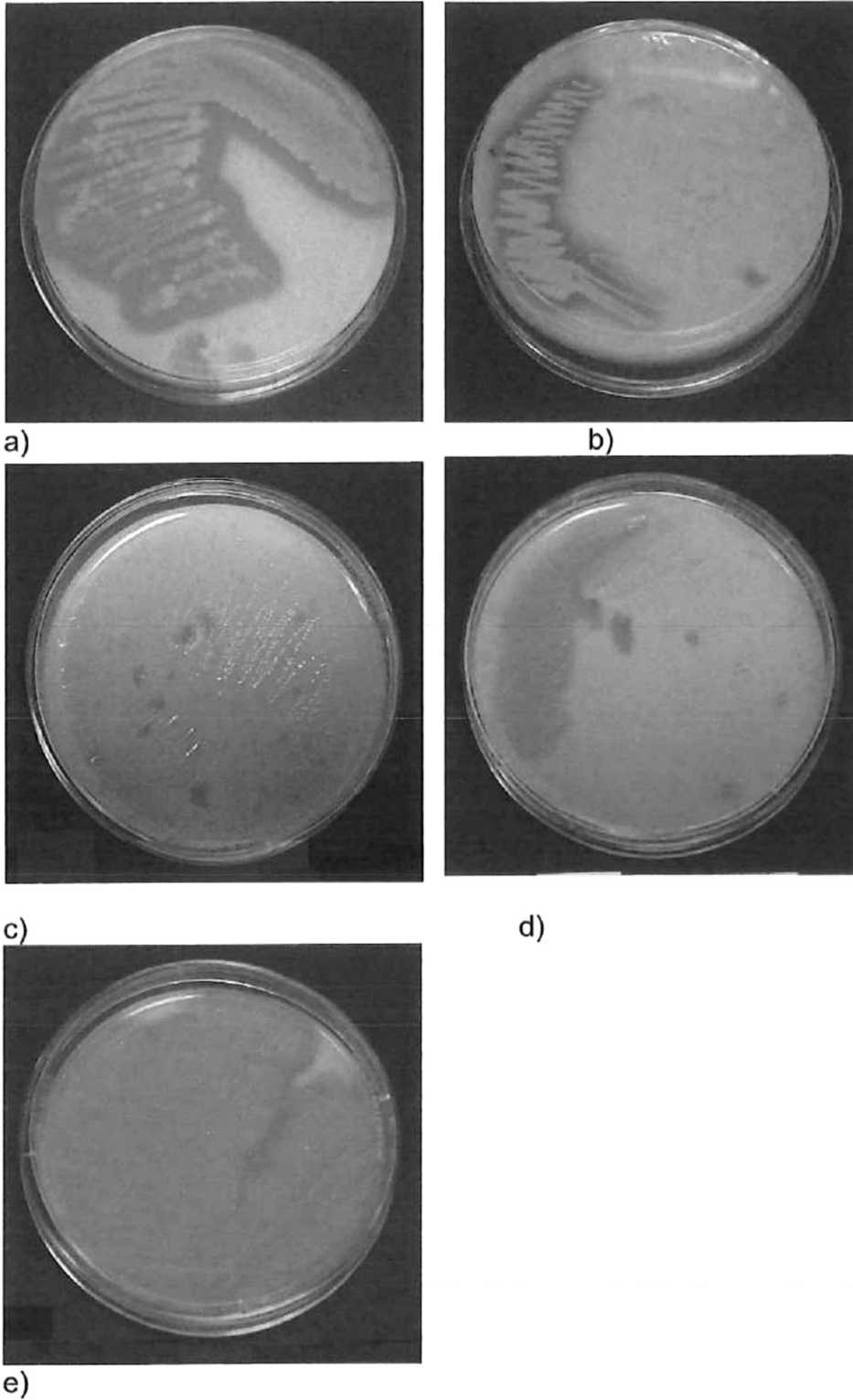
IV RESULTADOS

4.1. Identificación de cepas productoras de proteasas extracelulares

Las cepas utilizadas fueron: una cepa aislada identificada como *Vibrio* spp., y las cepas de colección *V. damsela* 33539, *Vibrio holisae* 35564, *V. fishery* 7744, *V. harveyi* 14126, todas ellas del ATCC (American Type Culture Cell). En todas ellas se observó producción de proteasas extracelulares, determinada por la aparición de zonas claras alrededor de las colonias crecidas en medio ZSM (Fig. 2).

4.2. Características de crecimiento en medio líquido de las cepas del género *Vibrio*.

Se realizaron las curvas de crecimiento y medición de actividad en dos medios de cultivo. La cepa *Vibrio* spp., tuvo un crecimiento rápido y la producción de proteasas fue detectada a las 4 h de crecimiento, coincidente con el inicio de la fase estacionaria (Fig. 3). *V. damsela*, *V. holisae*, *V. fishery*, *V. harveyi* iniciaron la producción de proteasas después de las 6 horas de cultivo (Figs. 4, 5, 6 y 7).



a) *Vibrio* spp b) *V. damsela* c) *V. fishery* d) *V. holisae* e) *V. harveyi* evidenciando la producción de proteasas.

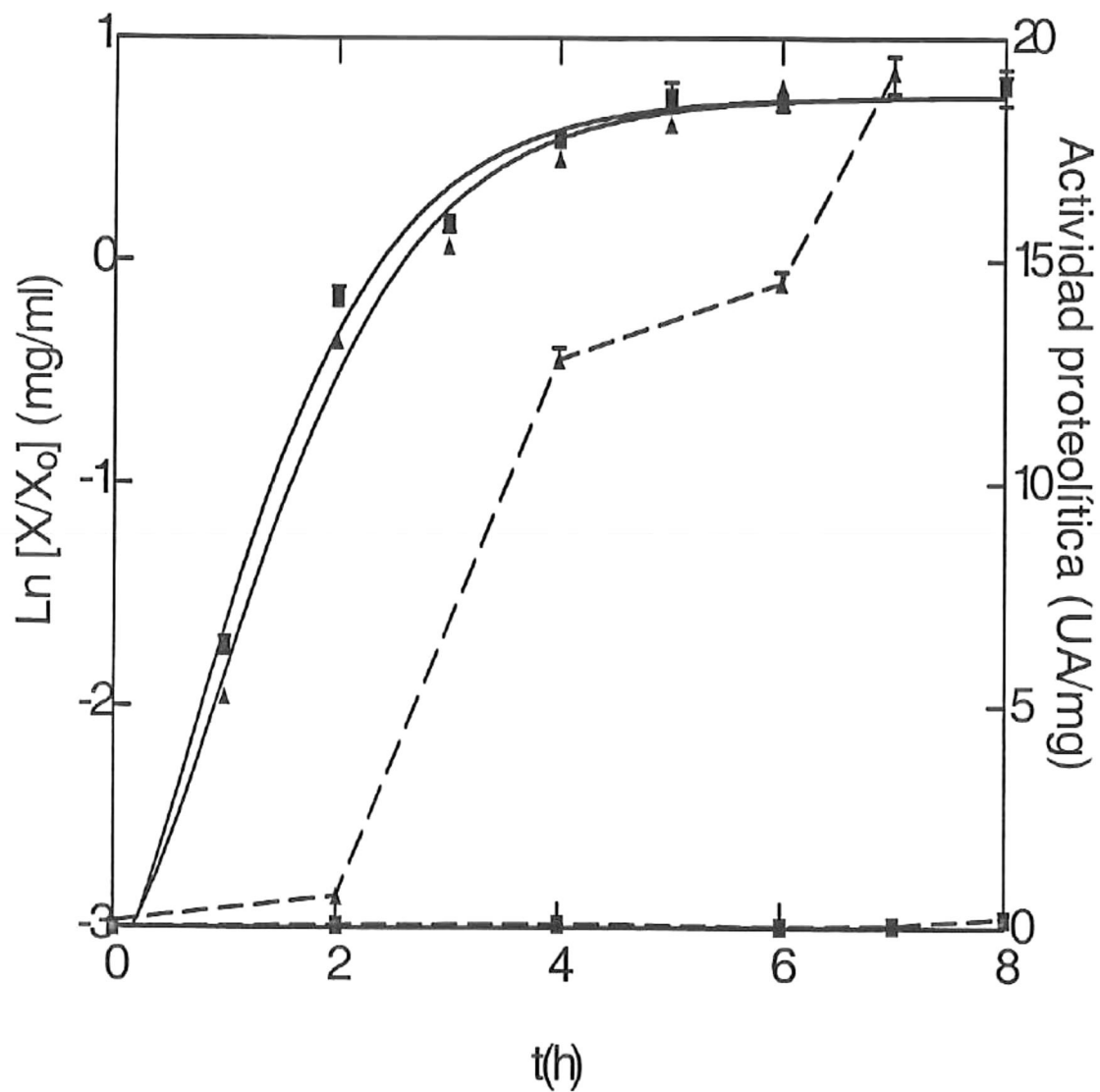


Figura 3. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio* spp. en diferentes medios de cultivo: Z (-■-), y ZSM (-▲-), (n=3, SD).

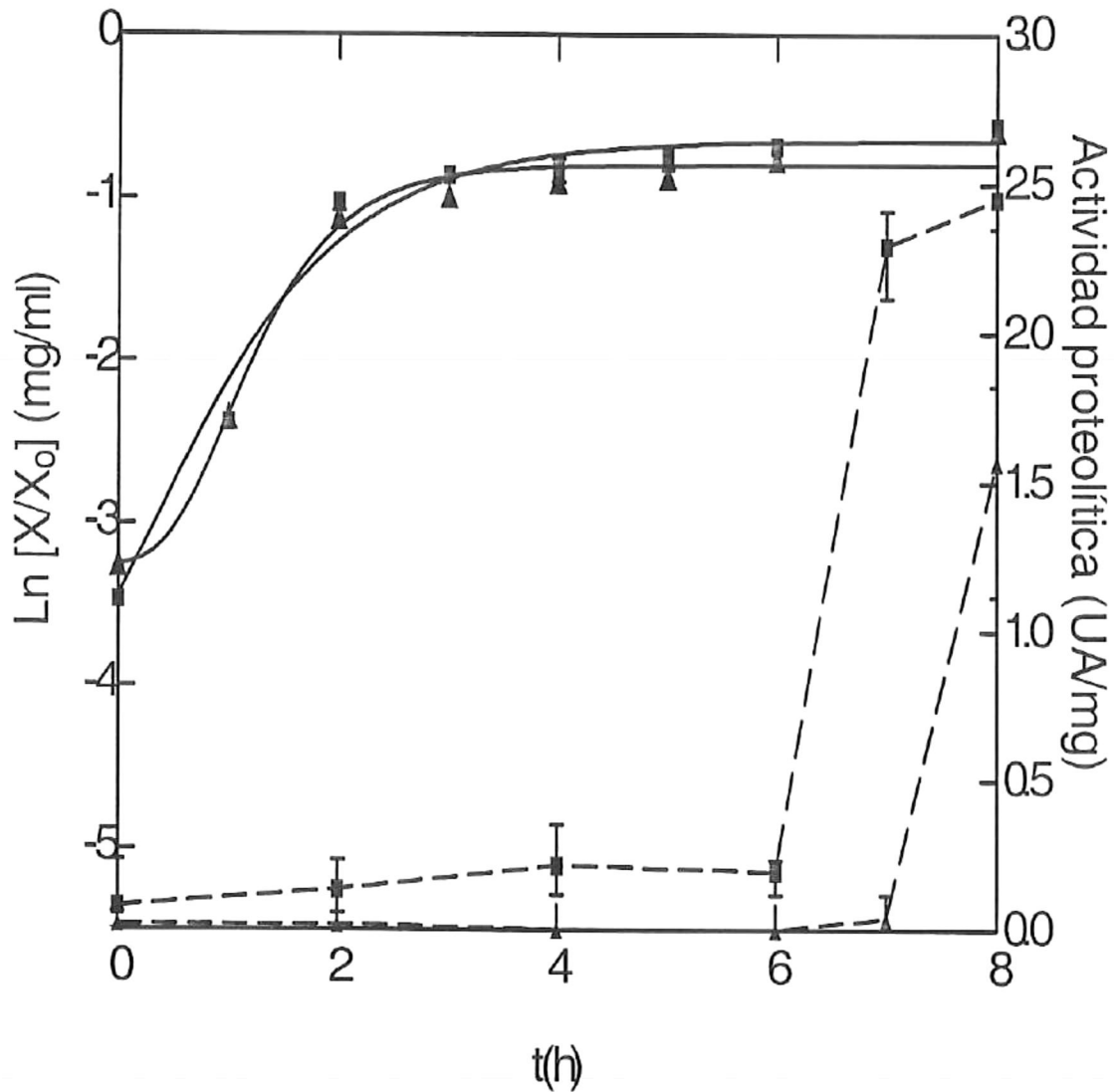


Figura 4. Curva de crecimiento y de producción extracelular enzimática de *Vibrio damsela* en diferentes medios de cultivo: Z (-■-), y ZSM (-▲-), (n=3, SD).

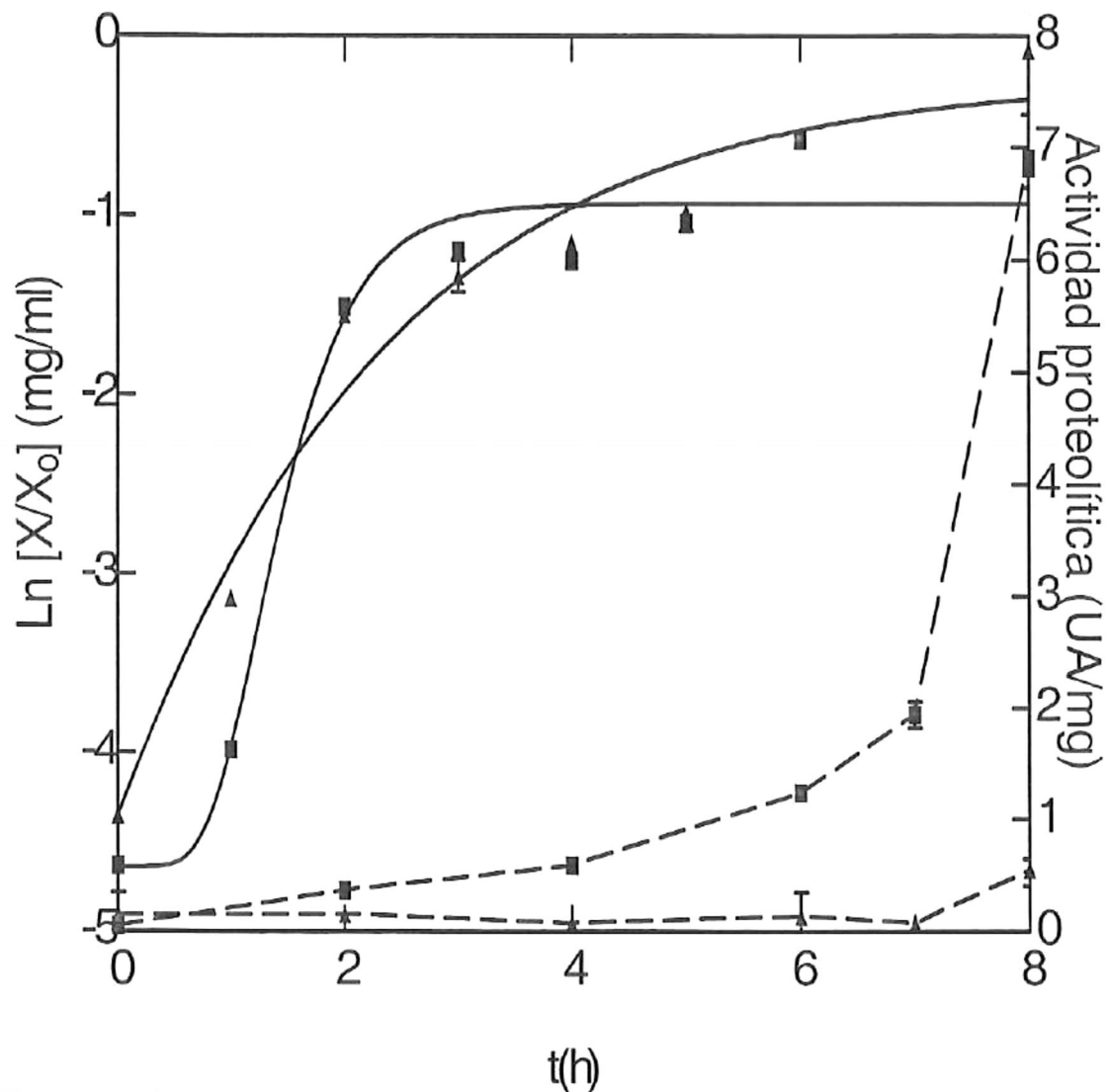


Figura 5. Curva de crecimiento (eje principal) y de producción enzimática de *Vibrio holisae* en diferentes medios de cultivo: Z (-■-), y ZSM (-▲-), (n=3, SD).

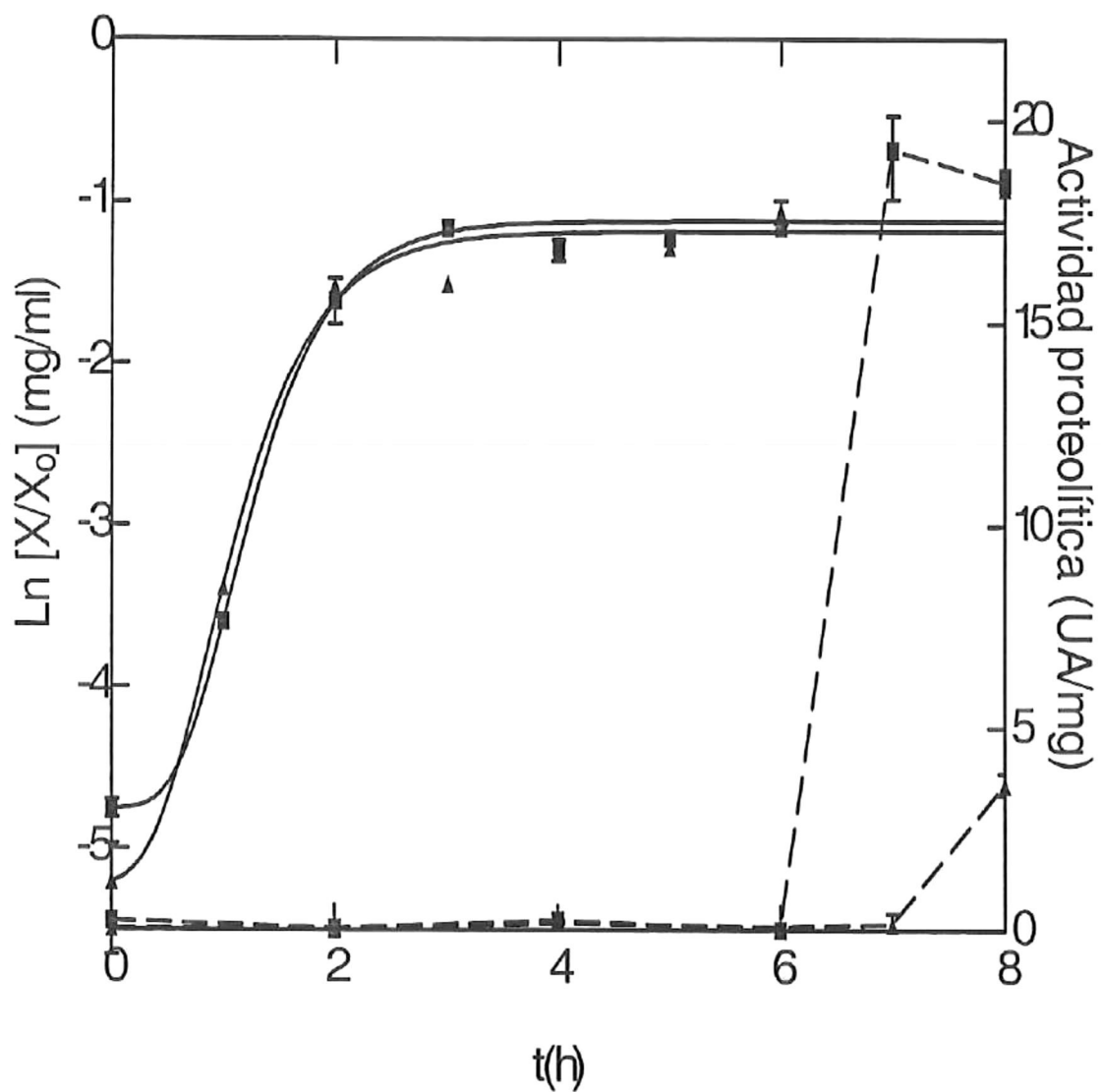


Figura 6. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio fishery* en diferentes medios de cultivo: Z (-■-), y ZSM (-▲-), (n=3, SD).

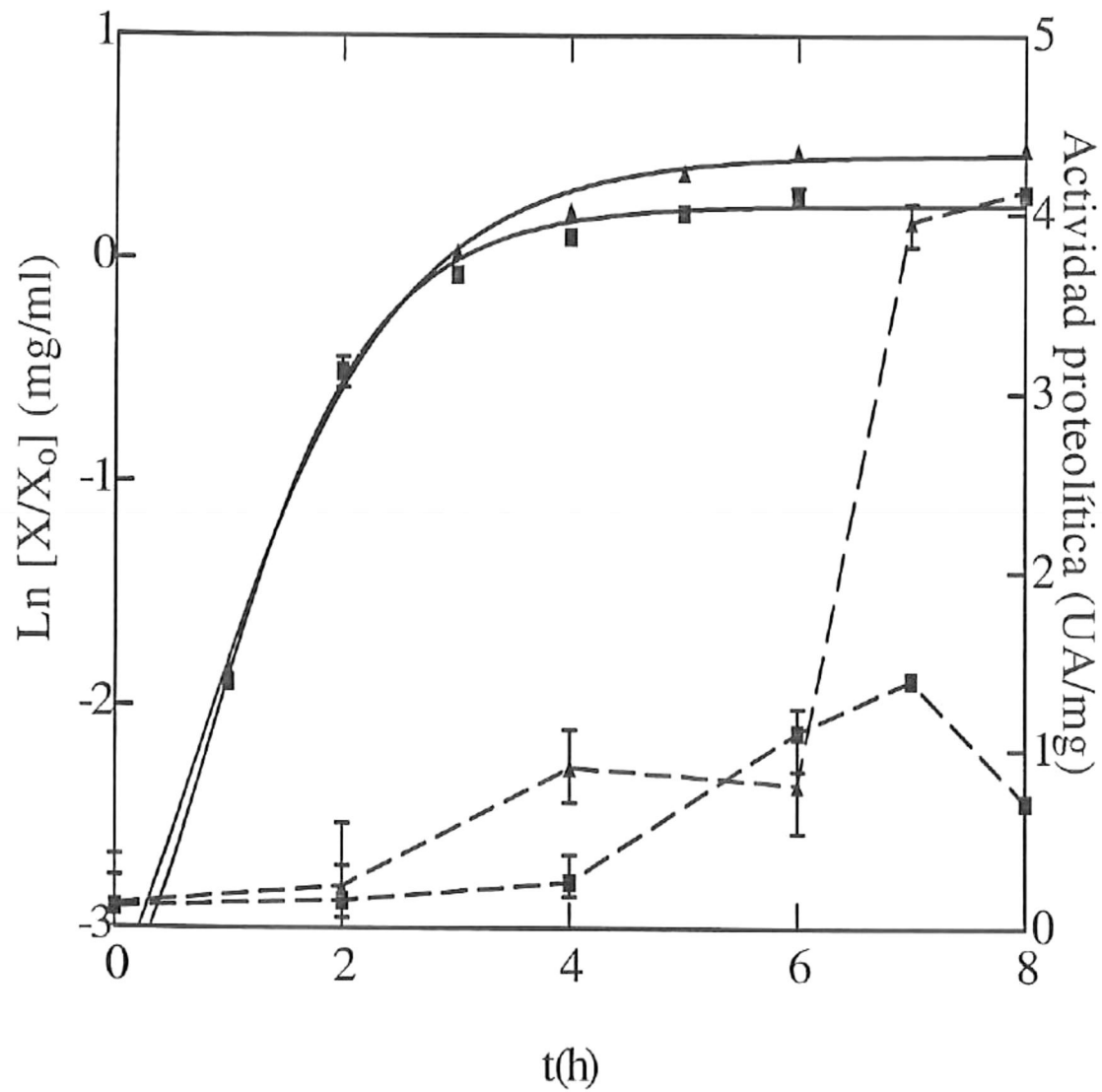


Figura 7. Curva de crecimiento y de producción enzimática de *Vibrio harveyi* en diferentes medios de cultivo: Z (-■-), y ZSM (-▲-), (n=3, SD).

Tabla I. Resumen de datos de crecimiento y actividad proteolítica de las cepas de estudio.

Cepas disponibles	Biomasa máxima (mg/mL)	Act. específica UA/mg
<i>Vibrio ordalli</i> ATCC 33509	(-)	0
<i>Vibrio fisheri</i> ATCC 7744	0.12	3.59
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	0.26	1.57
<i>Vibrio holisae</i> ATCC 35564	0.83	0.55
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	3.16	4.10
<i>Vibrio</i> spp.	6.02	19.2

En los cultivos, el crecimiento bacteriano al utilizar el medio Z y el ZSM presentó diferencias en biomasa y actividad enzimática. Esto se debe a que en la evaluación de actividad enzimática específica (cantidad de proteína igual), la actividad que se presenta utilizando el medio Z es menor que la del medio ZSM.

En la tabla I se resume el crecimiento y la actividad específica de las diferentes cepas crecidas en medio líquido Zobell. La determinación se realizó a las 8 h de cultivo. *Vibrio* spp. mostró la mayor actividad seguido por *Vibrio harveyi* y *Vibrio fisheri*. *Vibrio harveyi* posee una características de ser una cepa Gras no-patogénica identificada, por lo que se decidió continuar el resto del trabajo con esta cepa. Aunque *Vibrio* spp. presentó buenas características de crecimiento y producción de proteasas, requiere su caracterización microbiológica-molecular, así como pruebas de patogenicidad, las cuales se llevarán a cabo en otro trabajo.

4.2.1. Curva de crecimiento de *Vibrio harveyi* para la selección del medio de cultivo.

La curva de crecimiento de *V. harveyi* en ambos medios es rápido, aunque en medio Z la fase estacionaria se alcanzó a una menor densidad de células, la actividad proteolítica en este medio se observó hasta las 6 h, mientras que en medio ZSM la actividad se detectó a las 5 h llegando a un máximo a las 10 h, estando ya el cultivo en fase estacionaria (Fig. 8). La densidad de células en el medio ZSM fue 1.5 veces mayor que Z, con base en la absorbancia a 600 nm. La actividad proteolítica encontrada en medio ZSM fue 5 veces mayor que en medio Z. La concentración de proteínas durante el crecimiento fue diferente para ambos medios de cultivo (Fig. 9), al inicio la concentración de proteína en el medio ZSM fue mayor que la de Z, la cual se redujo conforme avanza el periodo de cultivo, cuando la concentración de proteína de ZSM empieza a caer hasta el mismo nivel que la concentración de proteína en medio Z, la actividad proteolítica aumenta considerablemente, y la actividad en medio Z no aumenta significativamente. Estos resultados sugieren que el SM puede inducir la aparición de enzimas proteolíticas.

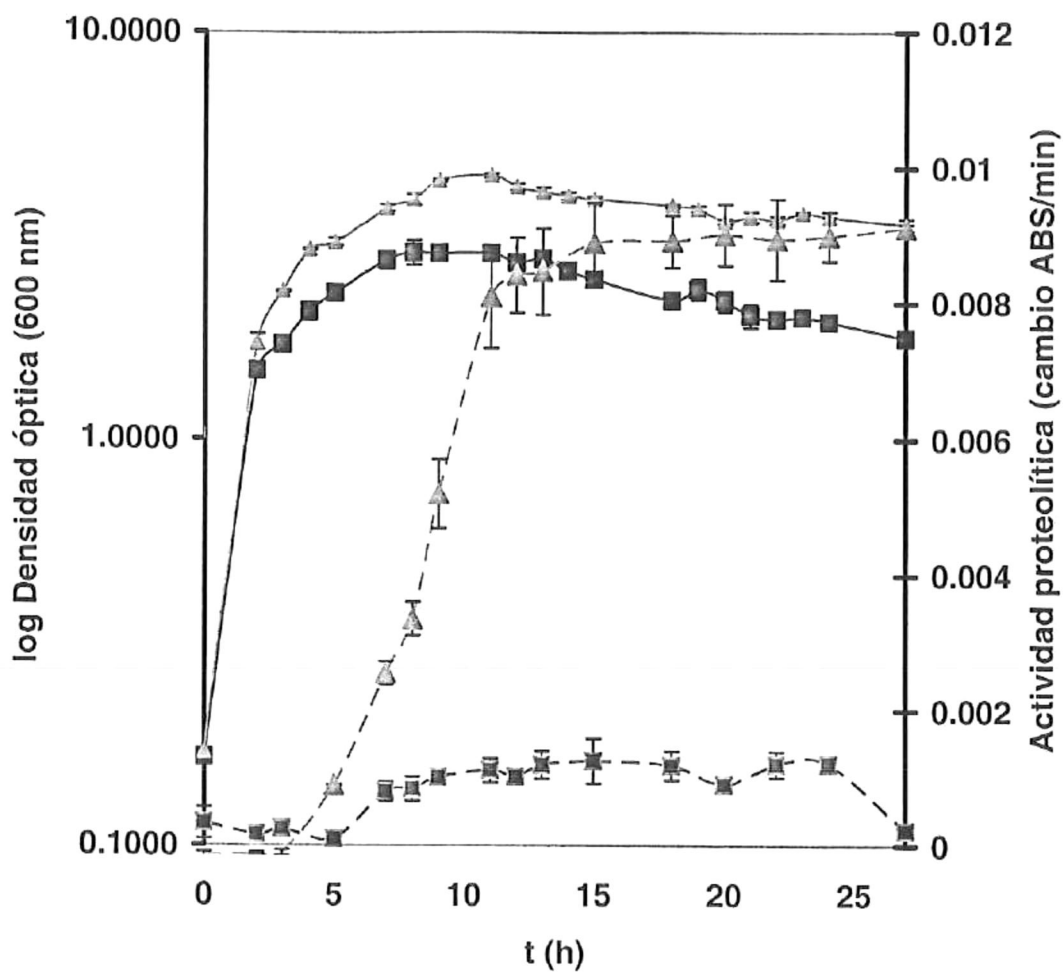


Figura 8. Curva de crecimiento y actividad proteolítica del cultivo de *Vibrio harveyi*, en dos medios: Z (-■-), y ZSM (-▲-). Línea continúa (densidad óptica) y líneas punteadas actividad enzimática, (n=3, SD).

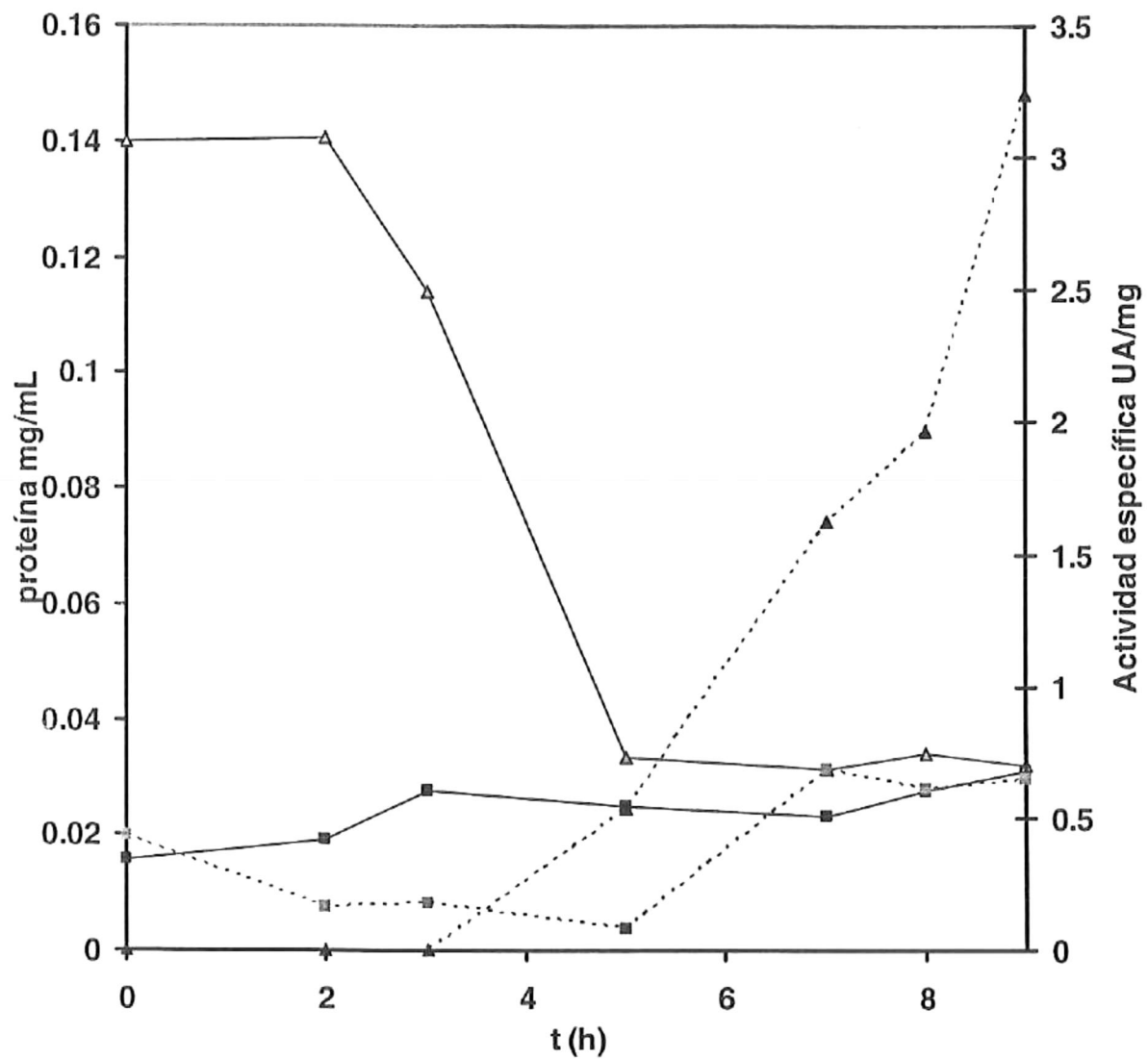


Figura 9. Comportamiento de la concentración de proteína en los medios: Z (-■-) y ZSM (-▲-) líneas continuas, en líneas discontinuas actividad proteolítica específica (UA/mg), (n=3, SD).

4.2.2. Determinación de la bioluminiscencia bacteriana en medio líquido.

Como característica de la producción de proteasas, la aparición de bioluminiscencia se produce al inicio de la formación de proteasas entre 3 y 7 h de cultivo, teniendo un máximo de aproximadamente 5.0 mV a las 5 h (Fig. 10).

Además, la intensidad bioluminiscente se caracterizó en un espectrofluorómetro Shimadzu RF540 el cual detectó el pico de intensidad bioluminiscente a los 490 nm, sin la adición de excitadores de la actividad (Fig. 11). En esta misma figura la curva de abajo se presenta la intensidad bioluminiscente detectada sin agitación de la muestra. Con base en estos resultados, la bioluminiscencia que presenta esta cepa es dependiente de oxígeno. En la figura 12 se puede apreciar las distintas etapas de intensidad bioluminiscente del cultivo en tubos Eppendorf, con lapsos de 40 min.

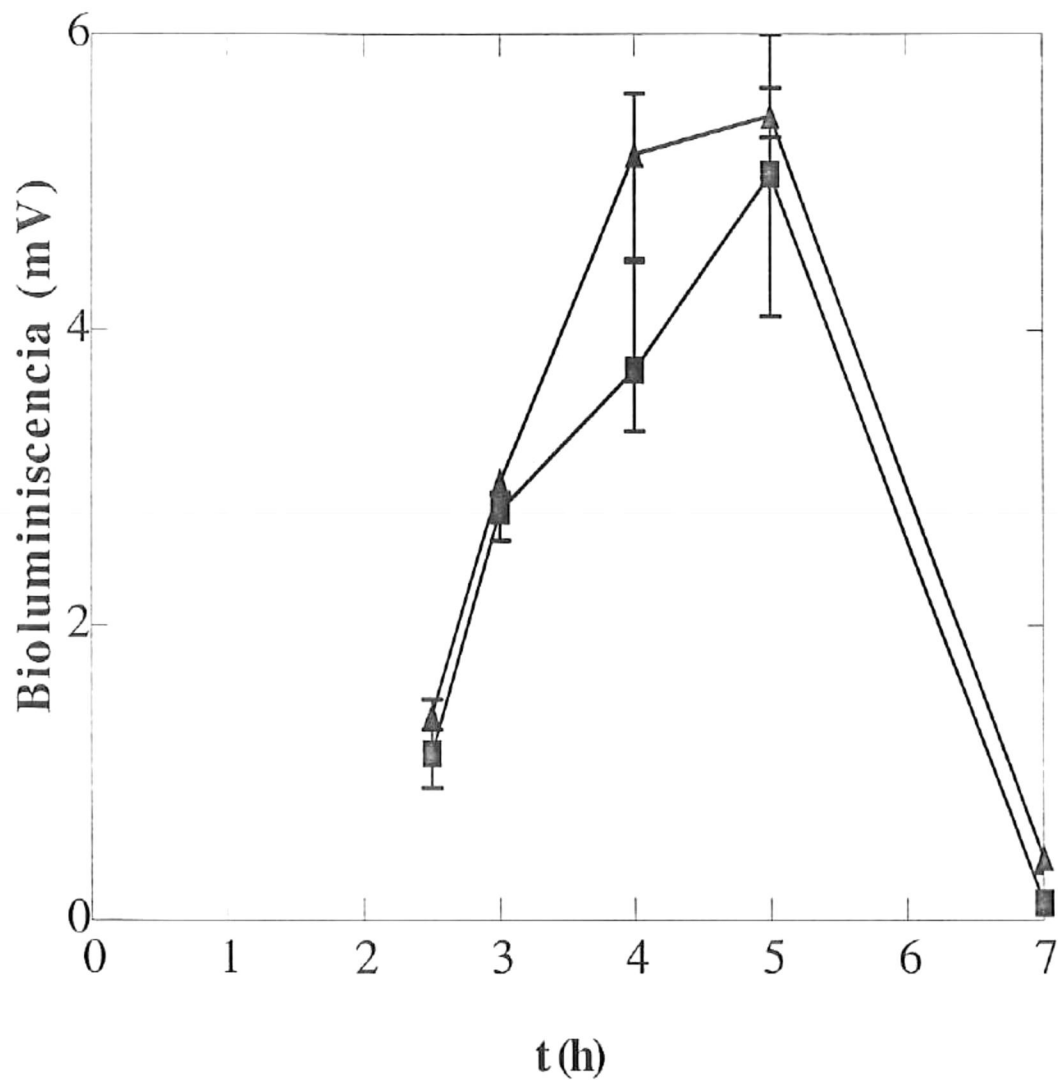


Figura 10. Comportamiento bioluminiscente del cultivo de *Vibrio harveyi* en dos medios de cultivo Z (■) y el medio ZSM (▲).

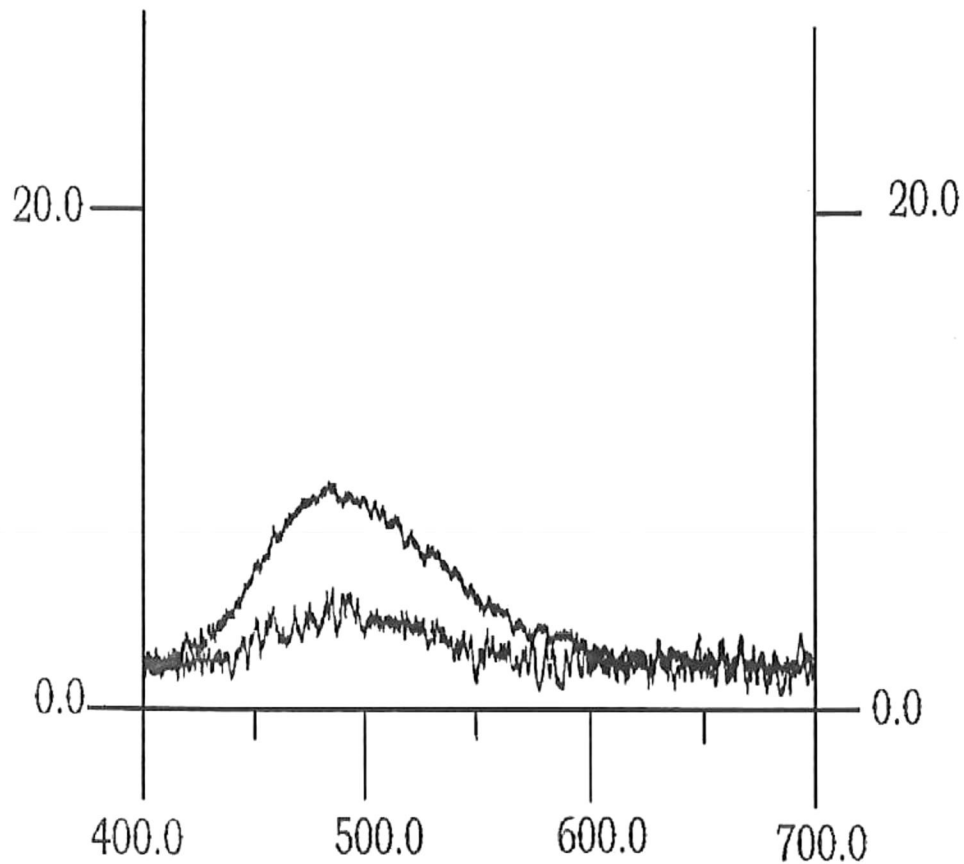


Figura 11. Característica espectral de la intensidad bioluminiscente de *Vibrio harveyi*. En la curva de arriba se presentan las lecturas previa intensa agitación de las muestras de cultivo, la curva de abajo la misma muestra sin agitación. Estas lecturas fueron obtenidas sin la adición de activadores de la bioluminiscencia utilizando un espectrofluorómetro Shimadzu RF540.

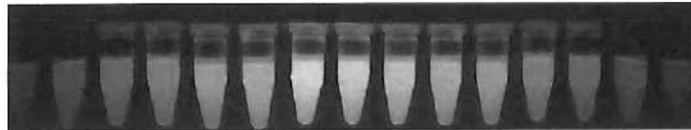


Figura 12. Progreso de la expresión de la actividad bioluminiscente del cultivo de *Vibrio harveyi* en el medio ZSM.

Expresión de bioluminiscencia en medio sólido.

La presencia de bactopectona induce la bioluminiscencia, inclusive aumentando la concentración de 2.5 a 5 % observamos un incremento pronunciado en la bioluminiscencia a las 24 h. Se observó que la carencia de bactopectona está directamente relacionada con pérdida de la emisión de bioluminiscencia, pero no así el crecimiento, el cual no se vio afectado al restringir este nutriente. El crecimiento se observó hasta las 96 horas.

Tabla II. Resultados de la bioluminiscencia colonial observada a simple vista para cada uno de los medios cada 24 h.

Medio de cultivo (g/L)	24 h	48 h	72 h	96 h
5 bactopectona, 1 levadura	++++	++++	++	+
5 bactopectona, 0 levadura	++++	+++	++	+
0 bactopectona, 1 levadura	+	-	-	-
5 bactopectona, 0.5 levadura	++++	++++	++	+
2.5 bactopectona, 1 levadura	+	+	+	+

intensa +++++, media +++, pobre ++, muy pobre + y nula -.

Obtención de las curvas de crecimiento de *Vibrio harveyi* en diferentes concentraciones de “skim milk”.

Se evaluó el efecto de la concentración del “skim milk” sobre el crecimiento y la producción de proteasas en *Vibrio harveyi*. Se utilizaron concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 1.0 % de “skim milk” en el medio de cultivo (Fig. 13). La velocidad de crecimiento a las diferentes concentraciones de SM no se ve afectada, pero la máxima concentración celular alcanzó mayor concentración cuando el medio tiene SM. A una concentración de 0.25 % de SM la fase estacionaria se retrasó cerca de dos horas, aunque después alcanza la misma densidad de células que las otras concentraciones de SM.

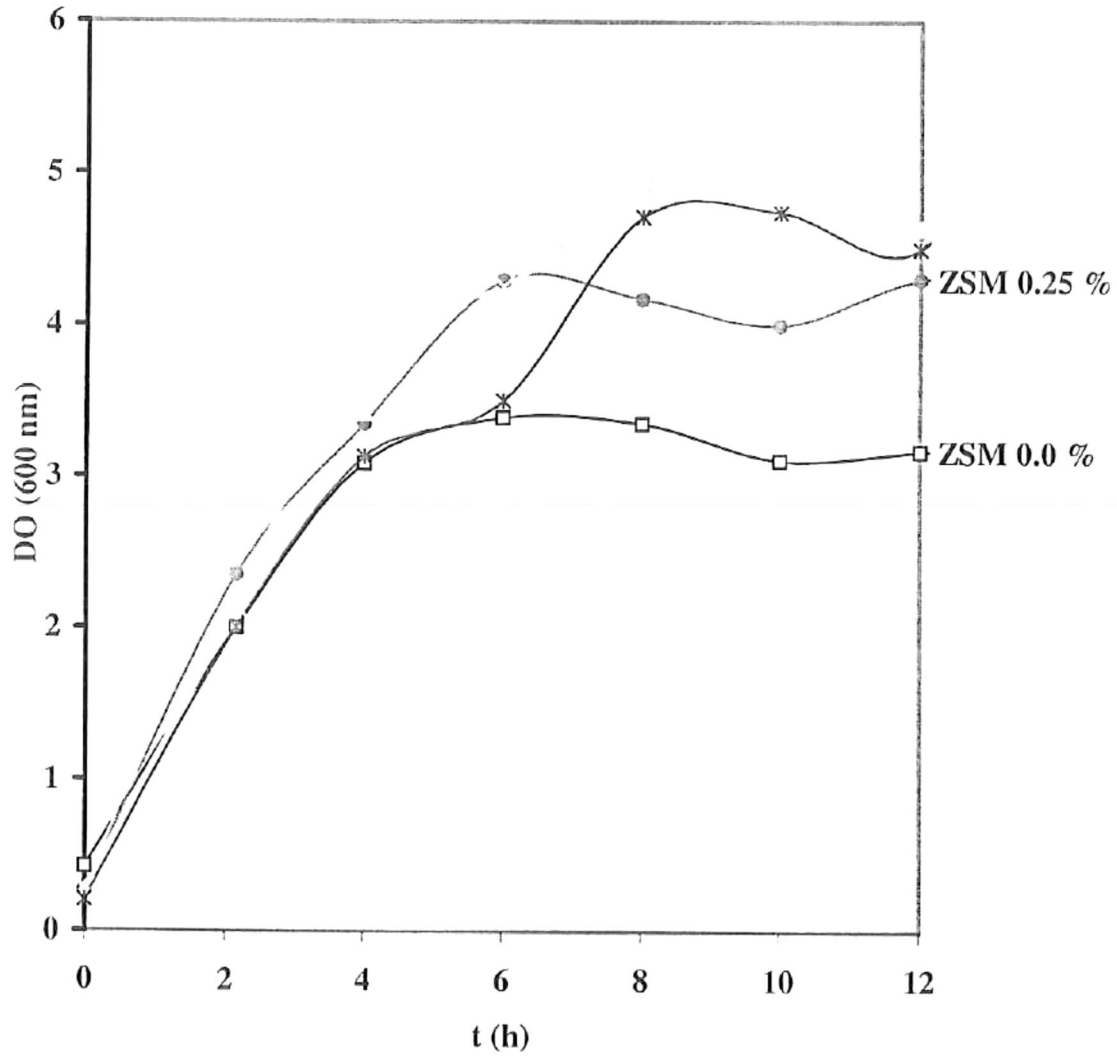


Figura 13. Curvas de crecimiento de *Vibrio harveyi* empleando diferentes concentraciones de skim milk: 0(-□-), 0.25(-◇-), 0.50(-▲-), 0.75(-○-) y 1.0(-x-) %, (n=3, SD).

La actividad proteolítica también fue evaluada en todas las concentraciones de SM (Fig. 14). Se observó que la actividad enzimática aumenta conforme la concentración de SM en el medio de cultivo aumentó. Todos los cultivos con SM presentaron una formación de proteasas significativamente mayor que el cultivo sin SM. A una concentración de 1.0 % la producción de proteasas fue significativamente mayor que el resto de los ensayos. Sin embargo, aunque se encontró una mayor formación de actividad proteolítica a concentraciones mayores de SM en el medio de cultivo, por facilidad técnica y de análisis en lo sucesivo se utilizó la concentración de 0.25 % de concentración de SM en el medio de cultivo.

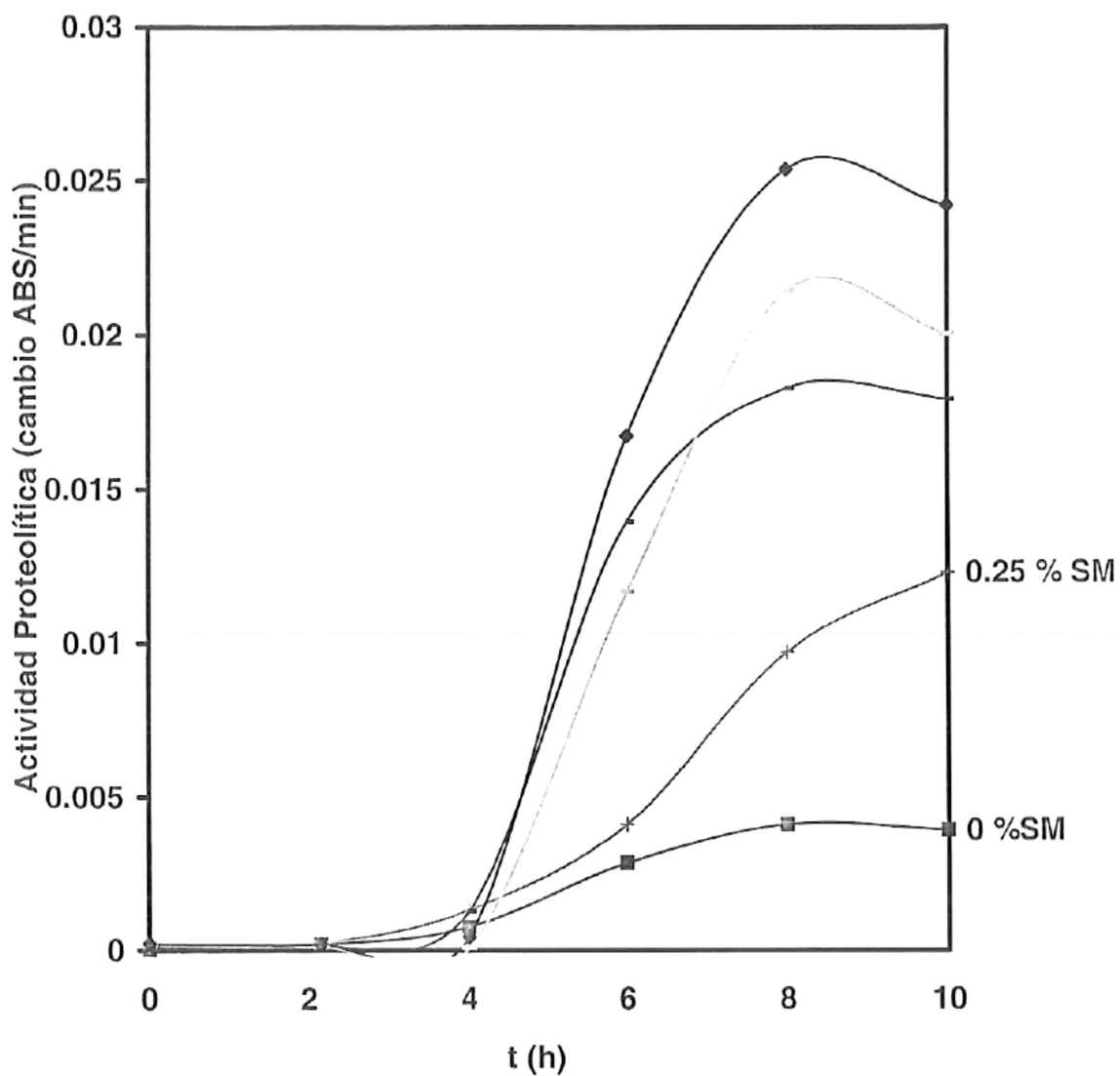


Figura 14. Determinación de la actividad proteolítica correspondiente a la curva de crecimiento de las concentraciones de skim milk: 0(-□-), 0.25(-◇-), 0.50(-▲-), 0.75(-⊗-) y 1.0(-x-) %, (n=3, SD).

4.3. Purificación y caracterización de proteasas.

El extracto crudo después del proceso de liofilización y diálisis no perdió actividad enzimática. Durante el proceso de ultrafiltración fue necesario utilizar hasta 60 psi durante 7 horas para concentrar 10 mL del preparado enzimático. Una vez que fue concentrado el extracto crudo se paso a través de una separación con base en la carga de la proteína utilizando la columna catiónica DEAE, debido a que la separación con base en exclusión molecular no fue suficiente para separar las enzimas de interés.

Las fracciones obtenidas de proteína a través de una columna de DEAE-celulosa se muestran en la figura15. Para la elusión se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl (0 – 0.5 M). Se obtuvieron dos picos entre 0.2 – 0.3 M de NaCl. Como se observa se presentan 3 fracciones proteicas importantes. En la figura16 se presenta el zimograma de cada una de las fracciones que se obtuvieron al realizar la elusión, como se puede observar en el zimograma la fracción 49 contiene la mayor actividad enzimática.

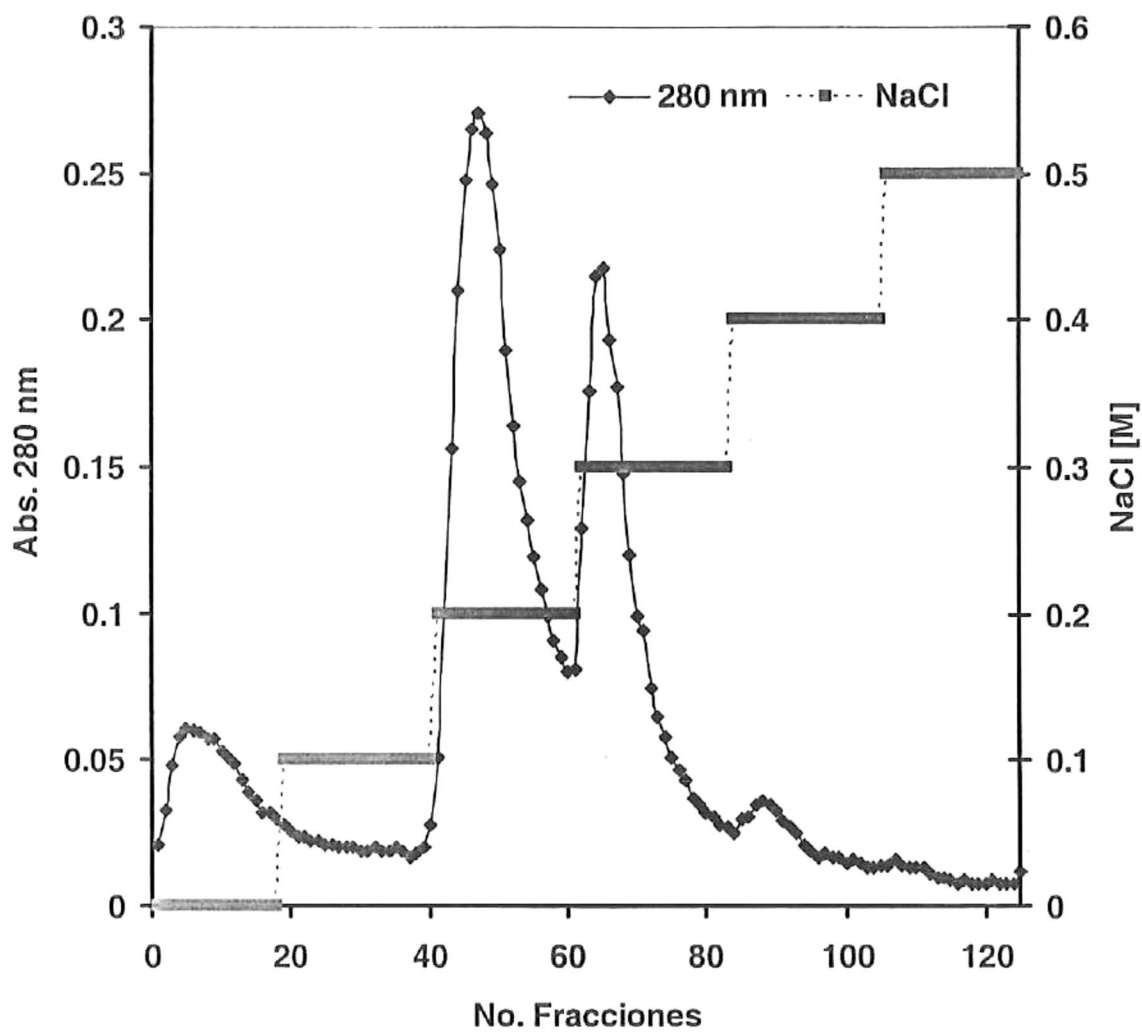


Figura 15. Elusión de proteínas utilizando una columna de DEAE celulosa. En el eje Y lecturas a 280 nm, en eje secundario Y se presenta la concentración de cloruro de sodio utilizado para la elusión. En el eje X se presenta el número de fracciones, (n=3, SD).

Se observó claramente que en la fracción 49 donde aparece el primer pico de concentración proteica (Fig. 16), también aparece la mayor actividad proteolítica, en la fracción 63 también se observa una banda tenue de actividad, igualmente correspondiente al segundo pico de actividad.

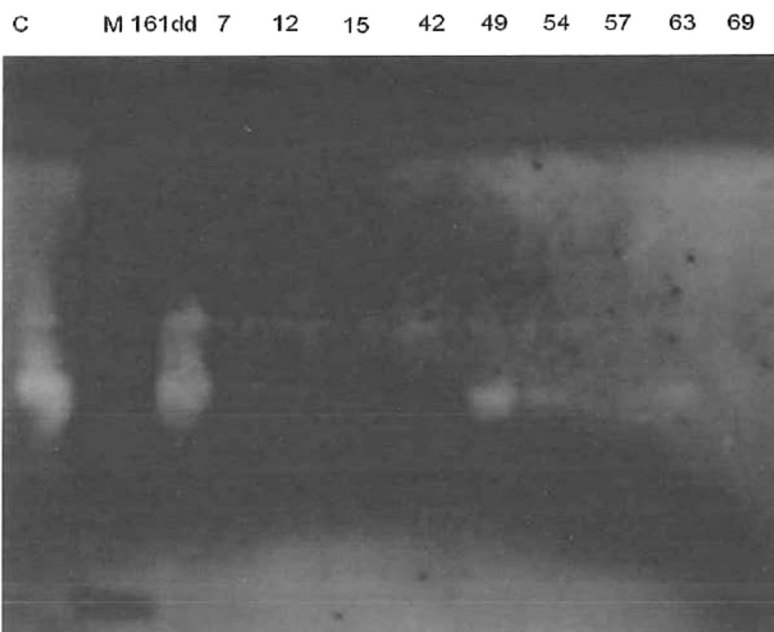


Figura 16. Zimograma de cada una de las fracciones proteicas (columna DEAE-celulosa). Carriles 1 y 3 concentrado de extracto crudo, 2.- marcador de peso molecular, 4 -12 distintas fracciones obtenidas de la columna DEAE-celulosa.

En la figura 17-a Se muestra el gel de tipo SDS-Page de la muestra purificada el cual fue teñido con plata observándose el grado de purificación alcanzada. En la figura 17-b se muestra el zimograma de la misma muestra en corrimiento simultáneo en cámara de electroforesis, observándose en los dos carriles la única enzima con actividad proteolítica presente.

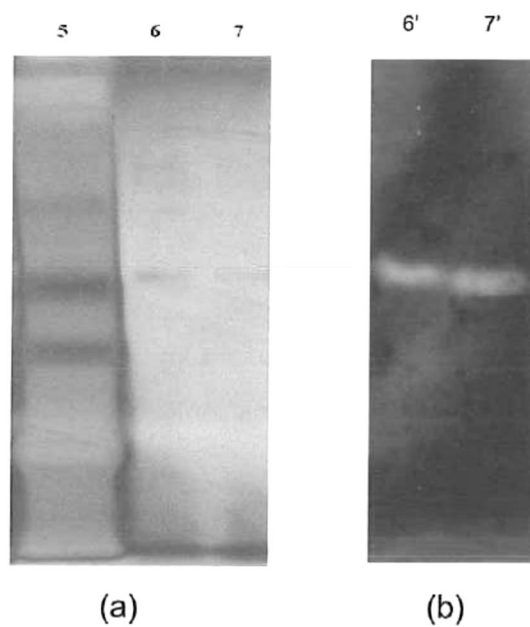


Figura 17. a) SDS-Page 5.- Marcador de peso molecular, 6,7 fracción purificada. b) carriles 6' y 7' zimograma.

En la tabla III se presentan los datos obtenidos para obtener los rendimientos y grado de purificación de la enzima. Como se puede observar la etapa de DEAE-Celulosa aumentó la actividad específica.

Tabla III. Evaluación de las etapas de purificación del extracto crudo de *Vibrio harveyi* utilizando azocaseína como sustrato.

Etapa de purificación	Volumen (mL)	Proteína mg/mL	Proteína	Actividad	Actividad	Rendimiento %	grado de purificación
			Total (mg)	Específica (UA/min)	Total		
Extracto crudo	180	0.043	7.72	3.26	25.17	1	1
Después de diálisis	43	0.087	3.75	3.45	12.94	0.51	1.06
Concentrado Ultrafiltración.	11.1	0.326	3.62	4.0	14.49	0.58	1.23
Después de columna DEAE	56.6	0.001	0.06	13.8	0.78	0.03	4.23

El concentrado es solo de 10 mL, volumen máximo para el equipo de ultrafiltración.

4.3.2.4 Determinación del peso molecular de las proteasas usando zimogramas.

De los extractos crudos de *Vibrio harveyi* obtenidos al final de la fermentación en ambos medios (Z y ZSM), se tomaron muestras y se cargaron en el gel revelado como zimograma el cual se presenta en la figura 18. En este zimograma se observa en el primer carril el marcador de peso molecular en el carril 4 se colocó 1.7 μg de proteína del extracto crudo del medio Z, en el carril 5 se colocó también 1.7 μg de proteína del extracto crudo del medio ZSM, en el carril 6 se colocó el mismo volumen que en el carril 4. Como se puede apreciar en este zimograma es evidente el aumento en la actividad enzimática al comparar ambas bandas de actividad. La proteasa que es inducida es la que corresponde una banda de aproximadamente 34 kDa. Esta etapa fue obtenida utilizando un gel de 12 % de concentración y un marcador de amplio rango.

En la figura 19 se presentan la gráfica para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas y la ecuación de la recta obtenida. En la figura 18 *Vibrio harveyi* presenta dos bandas de actividad una cercana a 40 y otra a 30 kDa, mientras que *Vibrio spp.* presenta una banda cercana a 33.4 kDa.

La resolución del peso molecular de las enzimas con actividad proteolítica obtenido en los zimogramas, varió al utilizar diferente marcador de peso molecular y concentración de acrilamida.

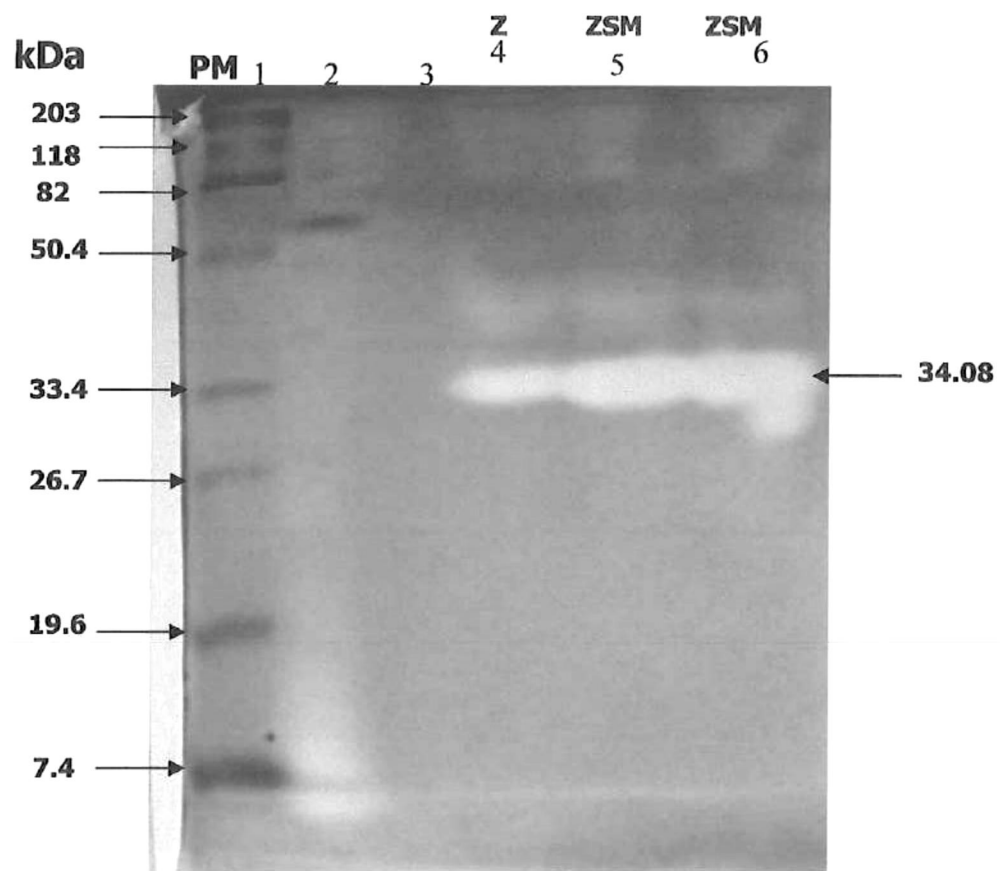


Figura 18.- Zimograma de los extractos crudos del cultivo de *Vibrio harveyi* en dos medios de cultivo, el tipo Z y ZSM, los carriles 4 y 5 con 1.7 μg de proteína, carriles 5 y 6 con el mismo volumen.

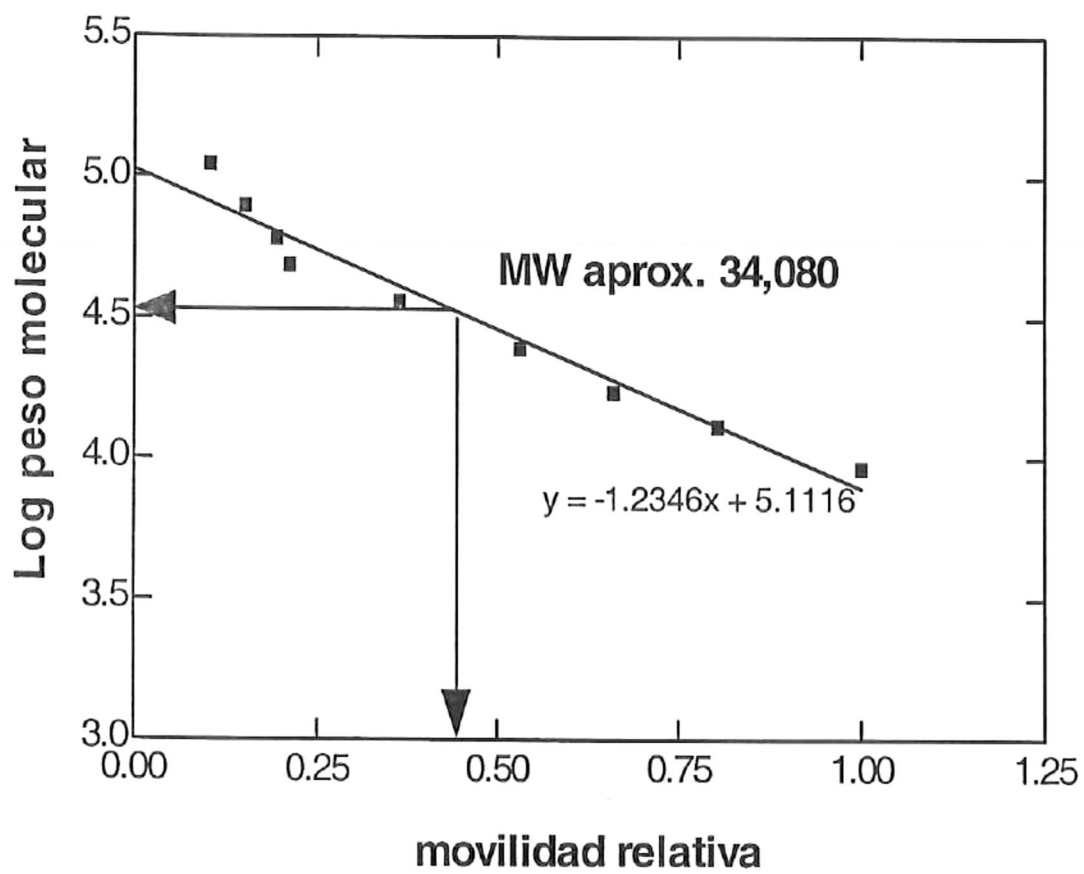


Figura 19. Relación de pesos moleculares de los marcadores de amplio rango y su respuesta en movilidad relativa sobre gel de acrilamida al 12 %.

El peso molecular de las proteasas presentadas en el gel de 12 % (figura 18) fue definido utilizando 2 marcadores que abarcan pesos moleculares de 203 a 7.4 kDa, sin embargo en los geles con 15 % de acrilamida se utilizaron los marcadores Dalton mark 4 (Sigma) y el marcador preteñido Kaleidoscopic (Biorad) estos marcadores manejan un rango de pesos moleculares de 14 a 66 kDa, siendo más cercanos para la determinación de pesos moleculares de estos rangos. Los resultados de los pesos moleculares obtenidos son 47, 40 y 35 kDa (ver figura 20). Además de obtener los pesos moleculares de la cepa en cuestión, se determinaron las proteasas presentes a las 8 h de cultivo en el sobrenadante de cada una de las cepas de este trabajo (ver figura 20) en donde se observa que *Vibrio harveyi* y *Vibrio spp.*, presentaron mayor actividad. En la figura 20 se observa el corrimiento de todos los extractos crudos bacterianos utilizados en este trabajo, y como se observa solo *Vibrio harveyi* & *Vibrio spp.* mostraron actividad proteolítica sobre el zimograma.

La medición de el peso molecular (de las proteínas) empleando SDS-Page y con una simple tinción del gel con la técnica de Azul de Comassie para revelar (Laemli, 1970) no fue efectiva, debido a la baja concentración de proteína que contiene el extracto crudo ($40 \mu\text{l} = 1.5 \mu\text{g}$) y al grosor del gel 0.75 mm, por lo tanto se emplearon los zimogramas.

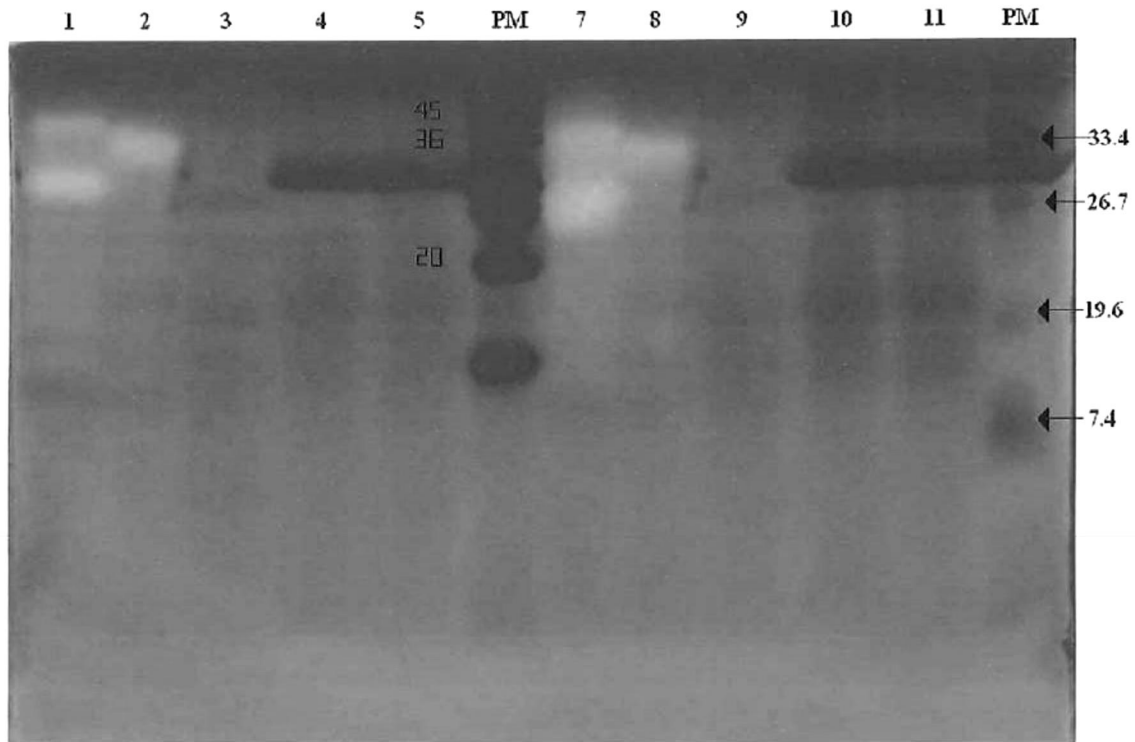


Figura 20. Zimograma de los extractos crudos bacterianos: carriles 1. *Vibrio harveyi*, 2. *Vibrio spp.*, 3. *Vibrio fishery*, 4. *Vibrio damsela*, 5. *Vibrio holisae* en medio Zobell 6. Marcador de peso molecular, 7. *Vibrio harveyi*, 8. *Vibrio spp.*, 9. *Vibrio fishery*, 10. *Vibrio damsela*, 11. *Vibrio holisae* en medio ZSM.

4.3.2.5. Caracterización proteolítica utilizando inhibidores en zimogramas

Se evaluó la inhibición enzimática utilizando la desaparición de las bandas de evidencia de actividad proteolítica en el zimograma. El efecto de los inhibidores sobre la actividad enzimática se presenta en la figura 21. Las áreas claras se cuantificaron utilizando el programa Quantity One de Biorad. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla IV. Se observó que el inhibidor EGTA, y los iones de Hg^{+2} y Cd^{+2} durante el corrimiento electroforético fueron separados de la enzima, ya que se observó una reactivación de la enzima en el zimograma, ya que en los estudios electroforéticos fue inhibida.

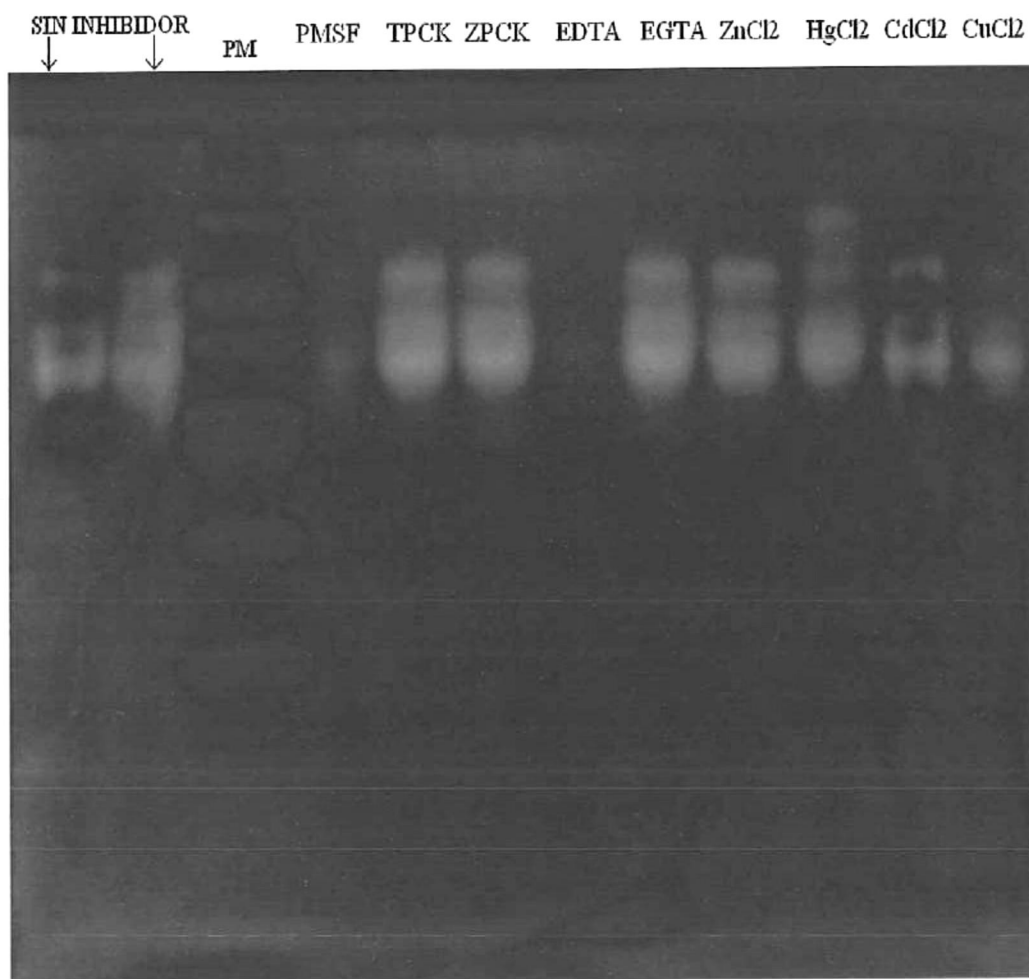


Figura 21. Zimograma del extracto crudo de *Vibrio harveyi* incubado ante la presencia de diferentes inhibidores, 1 y 2) extracto crudo sin inhibidor, 3) marcador de peso molecular, 4-12) diferentes inhibidores.

Tabla IV. Actividades relativas reportadas en % de las áreas de actividad del zimograma (Quantity One).

Inhibidor	Actividad Relativa (%)			Total Actividad	% inhibición	% activación
	47 kDa	Bandas 40 kDa	35 kDa			
Ninguno	100	100	100	100	0	0
PMSF	1	0	11	4	96	
TPCK	87	93	109	96	4	
ZPCK	100	130	117	115		15
EDTA	0	0	6	2	98	
EGTA	84	98	116	99	1	
ZnCl ₂	99	85	108	97	3	
HgCl ₂	21	59	105	61	39	
CdCl ₂	34	43	110	62	38	
CuCl ₂	18	24	91	44	56	

Caracterización de proteasas utilizando procedimientos espectrofotométricos.

4.3.2.7. Uso de inhibidores de actividad enzimática

Se realizaron ensayos de determinación de actividad enzimática utilizando el extracto crudo de *Vibrio harveyi* previamente dializado y liofilizado para esta etapa. Se evaluó el efecto de los inhibidores los cuales se presentan en la tabla V. En esta tabla se observa en % la actividad después de haber sido incubado el extracto crudo ante el inhibidor, también se presenta el % de inactivación de ésta. Se tomo como 100 % de actividad al extracto crudo al cual solo se le agregó el buffer en substitución del volumen de inhibidor de prueba.

La inhibición se presenta cuando se utiliza el PMSF, EDTA, EGTA $ZnCl_2$ y $HgCl$. Estos compuestos inhiben proteasas cuyo mecanismo sea de tipo serínico-metaloproteasa. Debido a que el inhibidor PMSF presentó una inhibición del 97 % de la actividad total, este inhibidor es específico para proteasas tipo serínico. Por otro lado, se evaluó el efecto de los iones Zn^{+2} sobre la actividad enzimática, observándose una inhibición de 97 %. Al evaluar los iones Cu^{+2} una inhibición del 89 %, para los iones de Hg^{+2} una completa inhibición (100 %), y por último los iones de Cd^{+2} una inhibición del 88 %. Con base en los resultados obtenidos el mecanismo de acción al que pertenece la proteasa es del tipo serínico, afectada negativamente por la presencia de algunos iones, los cuales inhiben impidiendo el ataque nucleofílico.

Tabla V. Efecto de algunos inhibidores sobre la actividad azocaseinolítica

Inhibidor	% remanente de actividad	% inactivación de actividad
none	100	0
PMSF	3	97
TPCK	77	23
TLCK	98	2
ZPCK	80	20
EDTA	9	91
EGTA	9	91
Bestatin	119	0
Pestatin	102	0
ZnCl ₂	7	93
CuCl ₂	11	89
HgCl ₂	0	100
CdCl ₂	22	78

Sustratos utilizados en la determinación de actividad proteolítica.

Para determinar la actividad proteolítica presente en el extracto crudo bacteriano se utilizaron distintos sustratos. El resumen de los sustratos utilizados se presenta en la tabla VI.

La principal actividad expresada por el extracto crudo fue de tipo quimiotripsina, utilizando Suc-APFNa como sustrato y se corroboró el tipo de actividad utilizando el sustrato BTEE. La actividad tripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa no fueron detectadas. En las etapas siguientes se determinaron las características cinéticas enzimáticas utilizando el sustrato

Suc-APFNa. Una unidad de actividad para BTEE se definió como el cambio de absorbancia a 256 nm de 0.001 por minuto.

Tabla VI. Sustratos utilizados en las determinaciones de actividad

Sustrato	Tipo de actividad	Actividad
Azocaseína 1 %	Proteolítica	2.5 UA
Hemoglobina 2 %	Proteasas ácidas	no detectada
L-Ala-p-nitroanilide 1.2 mM	Aminopeptidasa	no detectada
L-Arg-p-nitroanilide 1.2 mM	Aminopeptidasa	no detectada
L-Leu-p-nitroanilide 1.2 mM	Aminopeptidasa	no detectada
L-Met-p-nitroanilide 1.2 mM	Aminopeptidasa	no detectada
Suc-Ala-A-PF-Na 0.25 mM	Tipo-quimiotripsina	3.8 UA/mg
N-Benzoyl L-tyrosine Ethyl Ester	Tipo-quimiotripsina	4.1 UA/mg
Hippuryl-L-Phe 1 mM	Carboxipeptidasa	no detectada
Hippuryl-L-Arg 1 mM	Carboxipeptidasa	no detectada
BAPNA	amidasa-Tripsina	no detectada

4.3.2.8. Determinación del efecto de la concentración de cloruro de sodio

Para la determinación de este efecto se utilizaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0-2.25 M). Como se aprecia en la Fig. 22 se observó un aumento en la actividad al utilizar concentraciones entre 0.13 y 0.25 M de cloruro de sodio. Estos resultados sugieren que esta enzima requiere de la presencia de soluciones salinas del orden de 0.25 M. Al aumentar la concentración salina a 0.5 M empieza a presentar una inhibición de la actividad enzimática en función de la concentración salina. A una concentración de 2.25 M de NaCl la actividad tiene una inhibición de un 60 %.

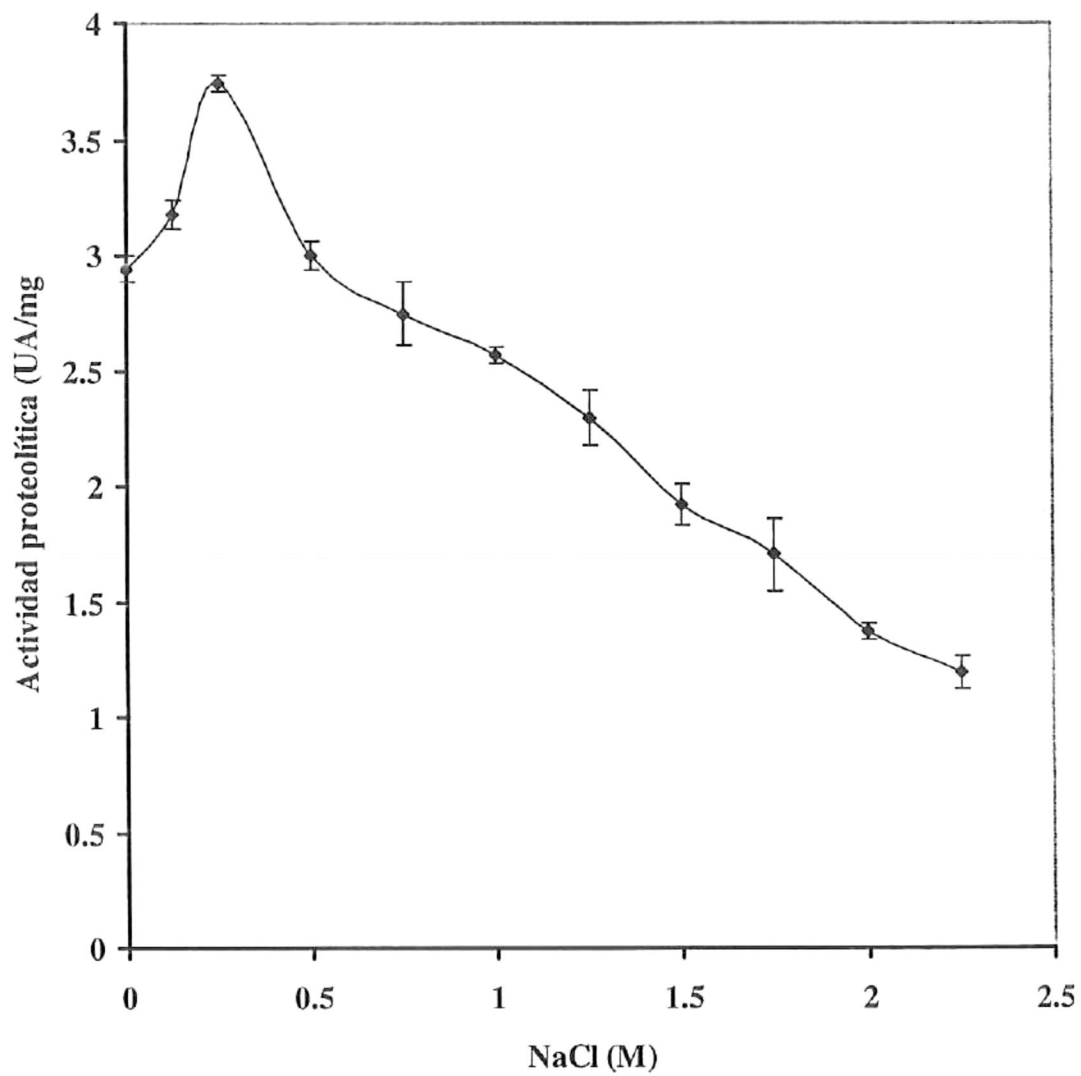


Figura 22. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la mezcla de reacción sobre la actividad enzimática.

Determinación del efecto de la temperatura.

Como se puede apreciar en la figura 23 la actividad enzimática proteolítica usando azocaseína presenta su máxima actividad a una temperatura de 55 °C y después de esta temperatura empieza un decremento de la misma de 6.3 % por cada grado hasta perder su actividad a los 80 °C.

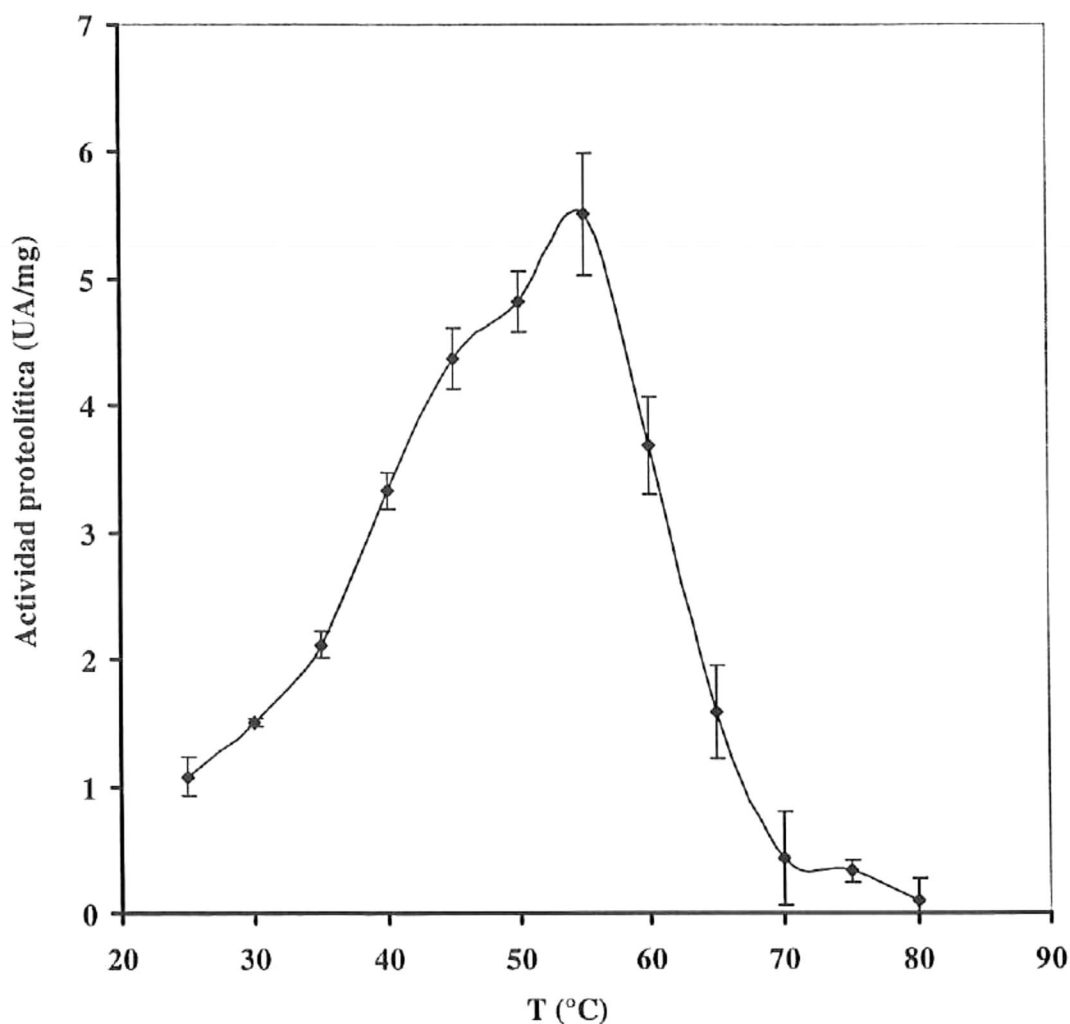


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica (UA/mg) del extracto crudo.

4.3.2.9. Determinación de la Energía de activación

Para la determinación de la energía de activación se utilizaron los datos de actividad obtenidos al usar las temperaturas de 25 a 50 °C correspondientes a la etapa de activación de la enzima. Para el cálculo de la energía de activación se utilizó la ecuación de Arrhenius. En la figura 24 se presenta en el eje Y el ln de la actividad enzimática específica versus el inverso de la temperatura en °K, de la parte correspondiente a activación se traza la línea recta. La energía de activación obtenida para este extracto crudo (dializado) es de 12.18 ± 0.66 kcal/mol.

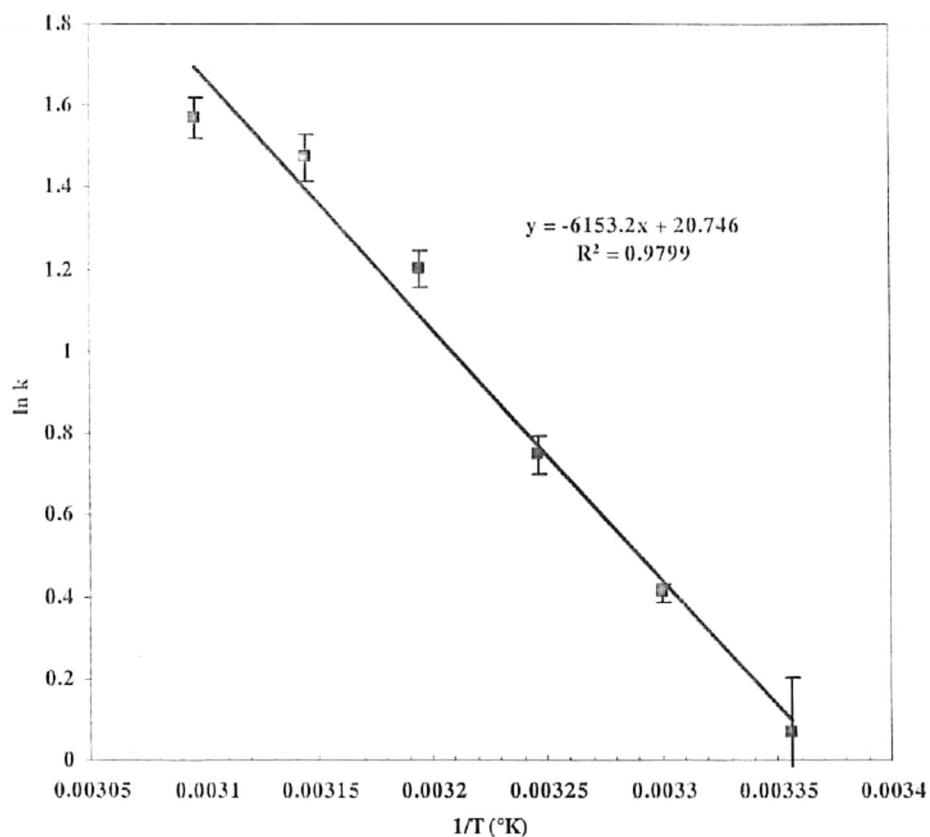


Figura 24. Actividad específica (ln k) versus el inverso de la temperatura en °K. La pendiente de la recta es $(-E_a/R)$.

4.3.2.10. Determinación de la estabilidad de la enzima a la temperatura

En la figura 25 se presentan las actividades enzimáticas remanentes después del periodo de incubación ante las diferentes temperaturas. Se observó que el preparado enzimático después de los 50 °C empieza a perder actividad. La temperatura de máxima actividad se observó a los 55 °C, sin embargo a esta temperatura y con las condiciones de determinación de actividad las enzimas empiezan a presentar inestabilidad enzimática.

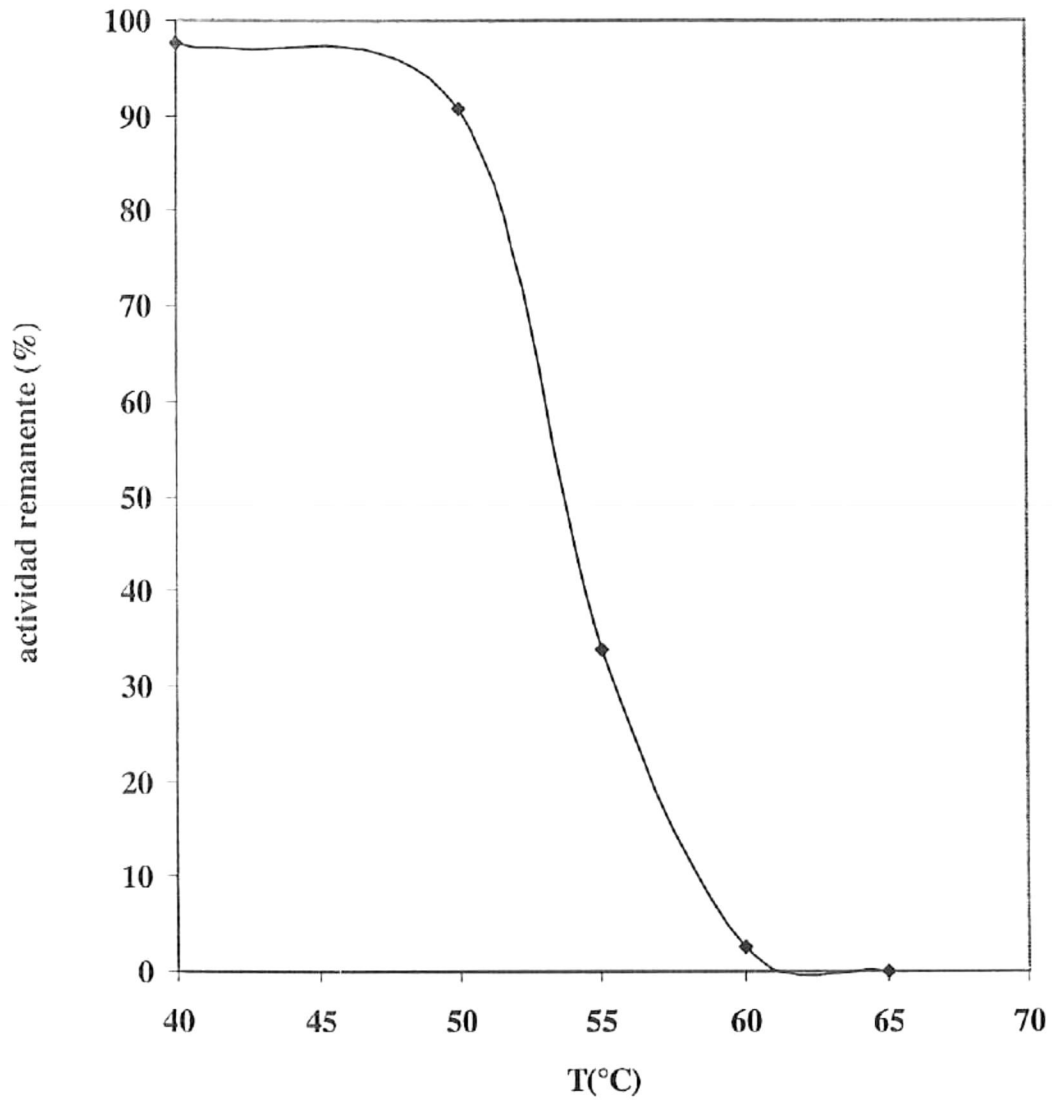


Figura 25. Actividades remanentes del extracto crudo después de un periodo de incubación de 30 minutos ante diferentes temperaturas.

Caracterización enzimática utilizando Suc-AAPF-Na.

Uno de los factores que son importantes en la determinación de actividad es la concentración del sustrato. En el ensayo de la determinación de la actividad tipo quimiotripsina, las metodologías difieren en la concentración de que se utiliza en la reacción. En la figura 26, se presentan las diferentes velocidades iniciales para cada una de las concentraciones de sustrato en celda encontradas para este sustrato, observándose la linealidad hasta 0.25 mM. Los parámetros cinéticos calculados usando la linearización propuesta por Lineaweaver-Burk, se obtiene una V_{max} de 0.25 min^{-1} y una K_m 0.93 mM para SAAPFNA.

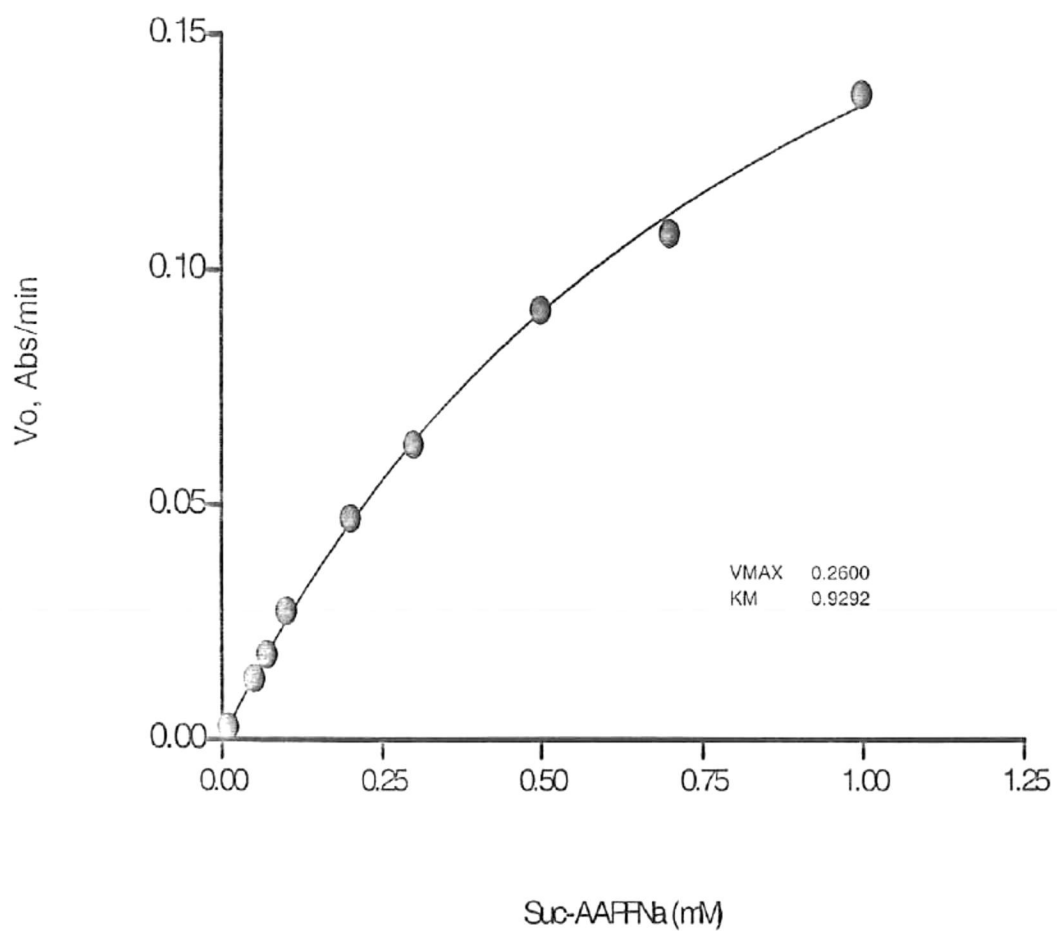


Figura 26. Efecto de la concentración de sustrato presente en la reacción de determinación de actividad tipo quimi tripsina.

Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad SAAFNA

Como se puede apreciar en la figura 27 la actividad enzimática quimi tripsina presentó su máxima temperatura de reacción a los 75 °C, aunque presenta actividad a los 90°C.

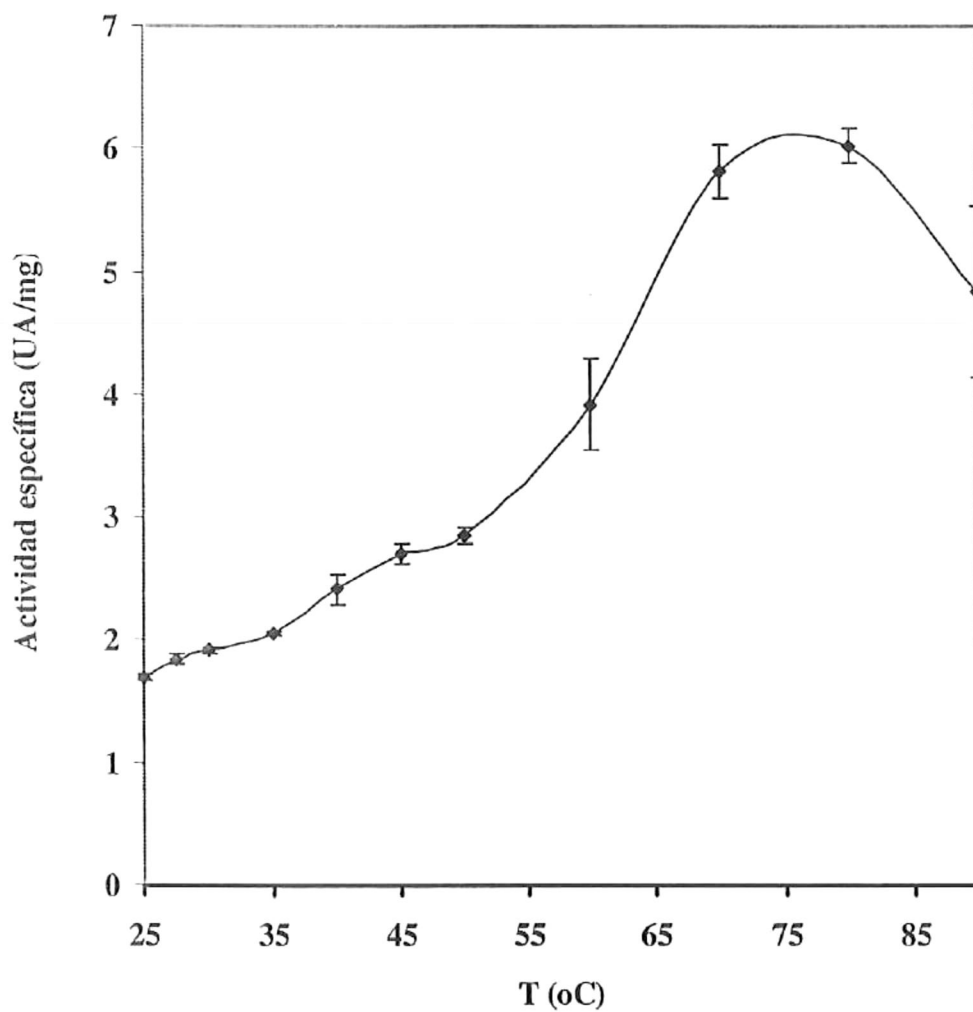


Figura 27. Comportamiento de la actividad tipo quimi tripsina del extracto crudo (dializado) ante diferentes temperaturas.

Determinación de la energía de activación

Para la determinación de la energía de activación se utilizaron diferentes temperaturas de 25 a los 70 °C y su cálculo fue usando la ecuación de Arrhenius. En la figura 28 se presenta en el eje Y el ln de la actividad enzimática específica versus el inverso de la temperatura en °K. De las lecturas obtenidas de la activación enzimática se trazó la línea recta para obtener $(-E_a/R)$.

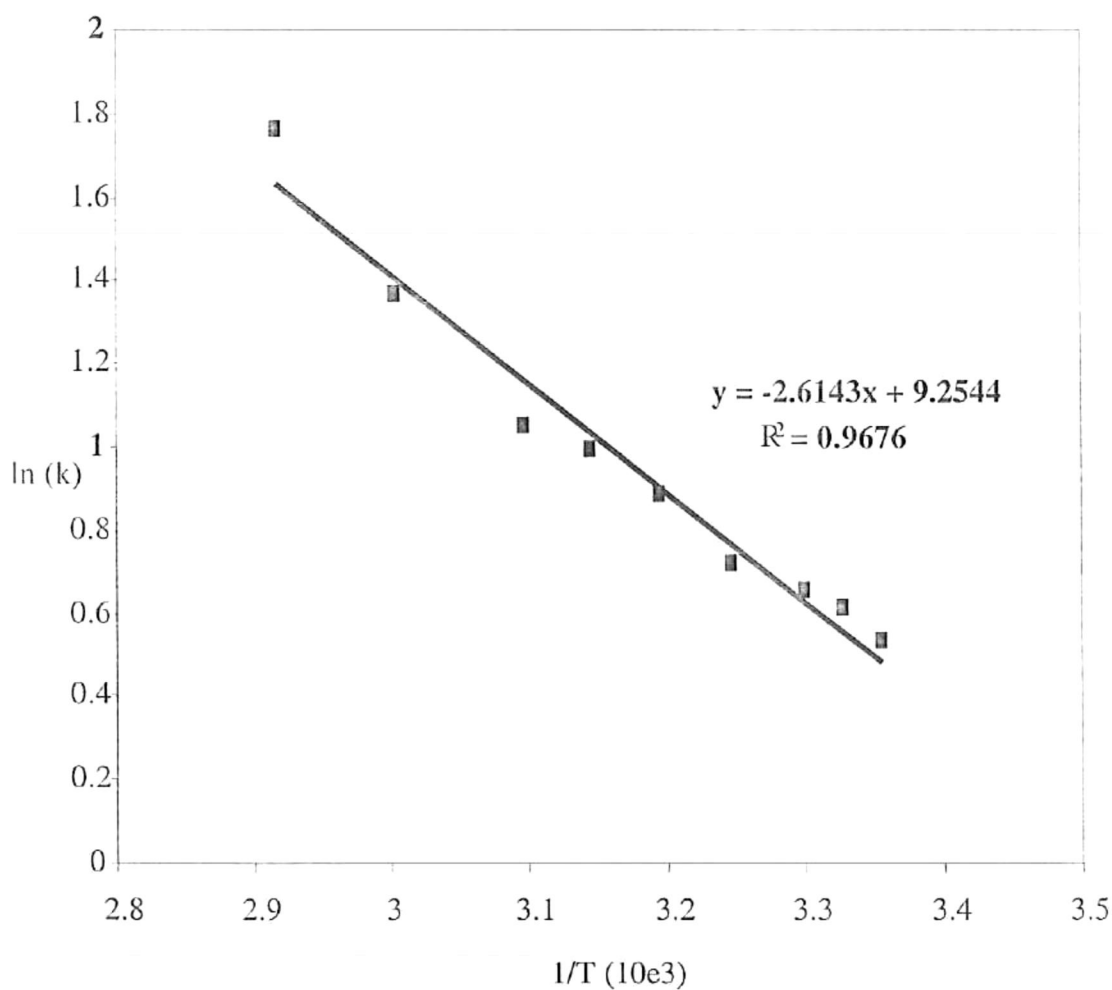


Figura 28. ln de la actividad tipo quimiotripsina versus el inverso de la temperatura en °K. La pendiente de la recta es $(-E_a/R)$.

La energía de activación obtenida para este extracto crudo (dializado) es de 4.2 ± 0.19 Kcal/mol. Con base en estos resultados la transformación substrato requiere de menor energía de activación.

Determinación de la estabilidad de la enzima

Para la determinación de la estabilidad del extracto crudo (dializado) se determinaron las temperaturas que soporta la enzima durante 30 minutos, de incubación. En la figura 29 se presentan las actividades enzimáticas remanentes. El preparado enzimático después de los 50 °C empieza a perder estabilidad a esa temperatura. La estabilidad observada al utilizar azocaseína fue similar. Sin embargo como esta determinación solo requiere de 3 minutos de reacción la temperatura óptima alcanzó un óptimo a los 80 °C debido a tiempo de reacción sugiriendo la estabilidad real de la enzima a la temperatura es de 50 °C.

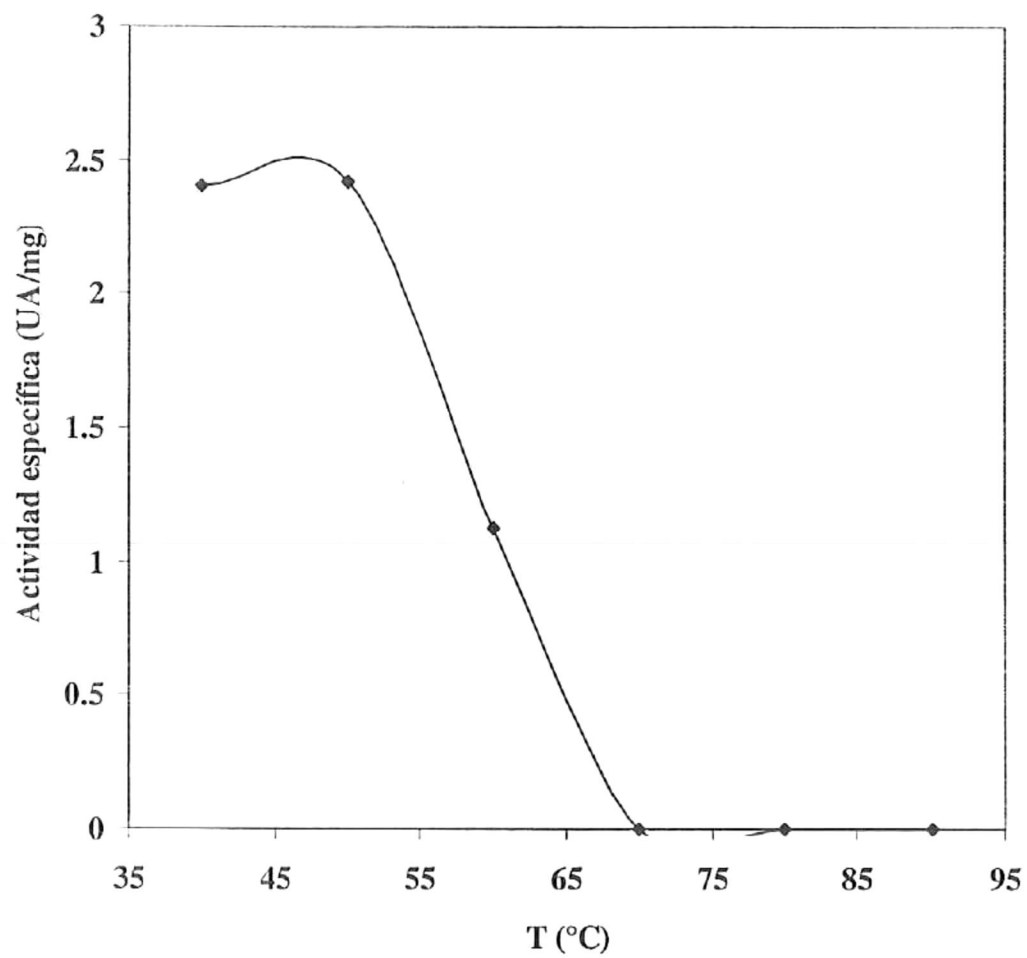


Figura 29. Actividad quimiotripsina remanente en el extracto crudo de *Vibrio harveyi*.

Determinación del pH de actividad quimiotripsina

Para la determinación del pH óptimo de actividad se realizaron diferentes soluciones de Suc-APF-Na utilizando Tris-HCl de pH 7 a 10. En la figura 30 se observa que el pH óptimo (9) utilizando este sustrato. El extracto enzimático analizado posee actividades de tipo alcalinas siendo ésta una característica de actividades tipo quimiotripsina.

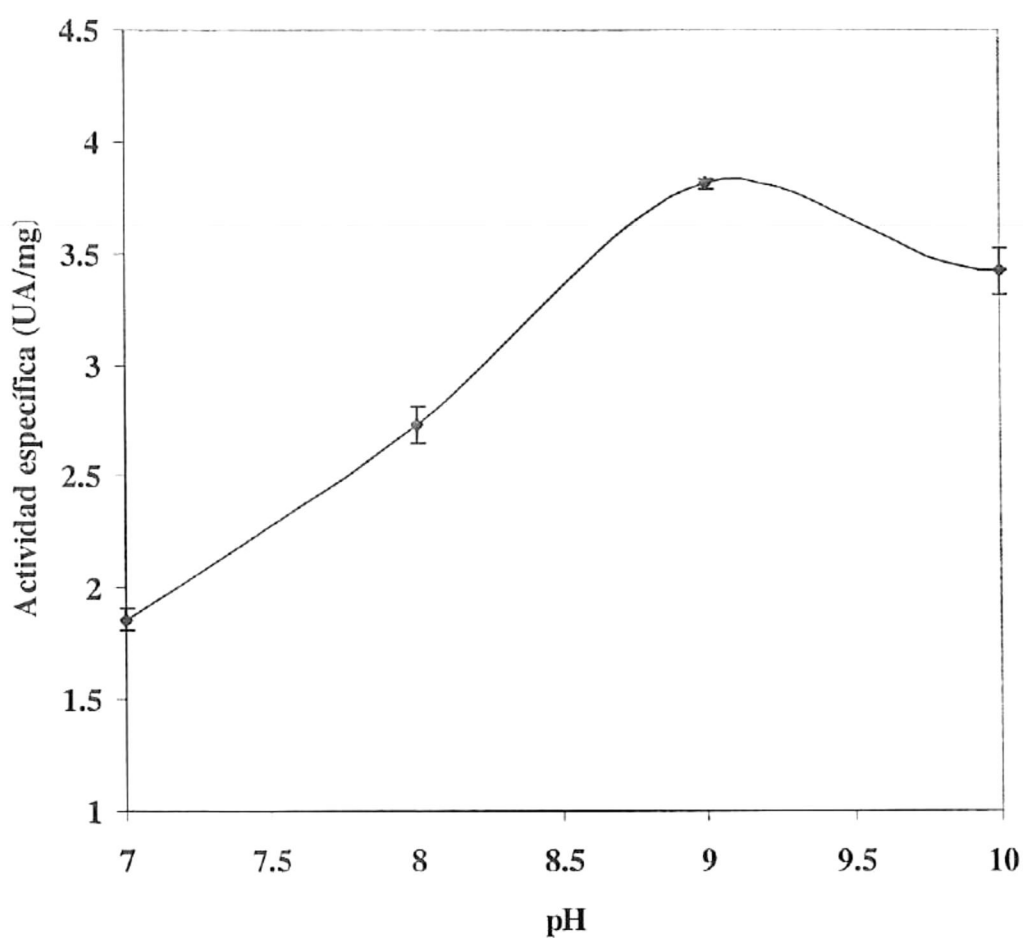


Figura 30. Actividades específicas del extracto crudo (dializado) ante diferente pH.

4.4. Estudios en fermentador

4.4.3. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de proteasas en fermentador

Se ha determinado el comportamiento de la biomasa en un fermentador Applikon, bajo diferentes flujos de aireación y velocidades de agitación. Se monitoreó la densidad óptica a 600 nm de estos cultivos, cuyos datos fueron convertidos mediante la relación de peso seco a mg/mL curva previamente realizada (Fig. 31). El comportamiento de la bacteria fue determinado en los medios de cultivo Z y el ZSM. La bioluminiscencia se observa en la figura 32.

Vibrio harveyi mostró un rápido crecimiento en ambos medios de cultivo tanto en Zobell como en el medio ZSM. La tasa específica de crecimiento (μ) a 700 rpm y 0.8 vvm de aireación fue de $0.297 \pm 0.036 \text{ h}^{-1}$ para el medio Z y de $0.523 \pm 0.027 \text{ h}^{-1}$ en el medio ZSM. La concentración final de biomasa fue de 1.49 mg mL^{-1} y 2.37 mg mL^{-1} para el medio Z y el medio ZSM, respectivamente representando un incremento de 1.6 veces. La producción de proteasas a la octava hora de cultivo fue de 0.9 y 3.32 unidades de actividad en el medio Z y en el medio ZSM respectivamente (Fig. 33). La producción de proteasas aparece en la fase estacionaria de cultivo y es inducida por la presencia de "skim milk".

4.4.4. Coeficiente de conversión de densidad óptica a peso de biomasa seca.

En esta etapa se realizó la conversión de las unidades de absorbancia a peso seco por lo que se monitoreo la absorbancia a 600 nm del cultivo *Vibrio harveyi* y se determinó la biomasa en peso seco (mg/mL). Con base en la regresión de los puntos fue posible determinar la ecuación de la recta $y=2.865x$, por lo que cada una de las densidades ópticas fueron convertidas a peso seco en mg/mL ver figura 31.

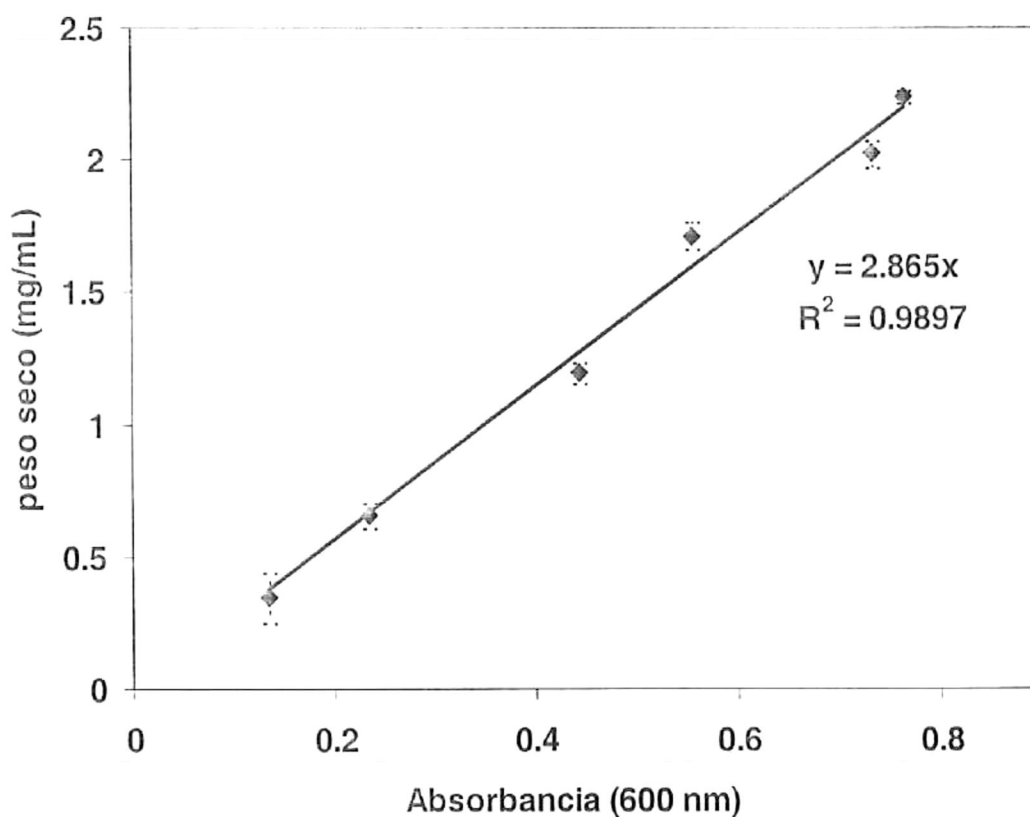


Figura 31. Gráfica de relación de peso seco (mg/mL) contra absorbancia (600 nm) del cultivo de *Vibrio harveyi*

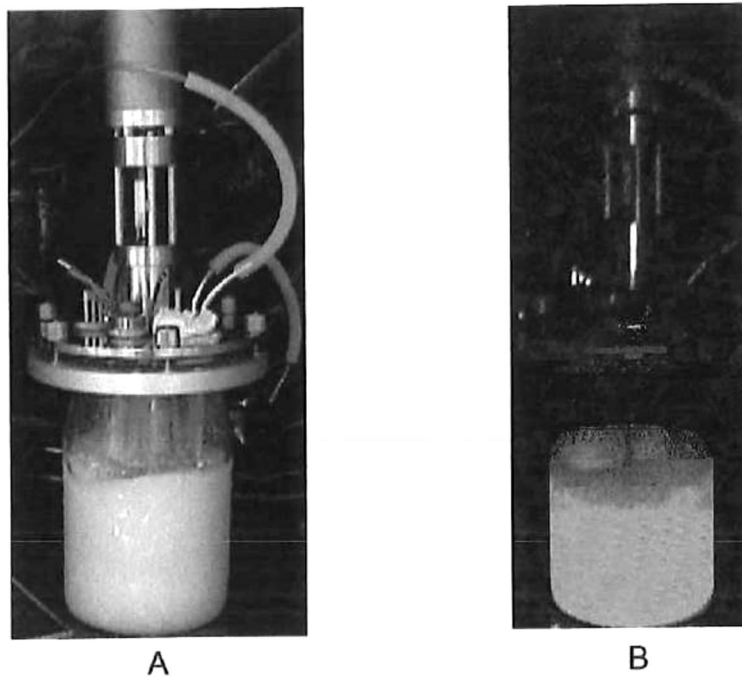


Figura 32. Cultivo de la cepa *Vibrio harveyi* en fermentador. A) fotografía tomada con luz y B) oscuridad utilizando video filmación.

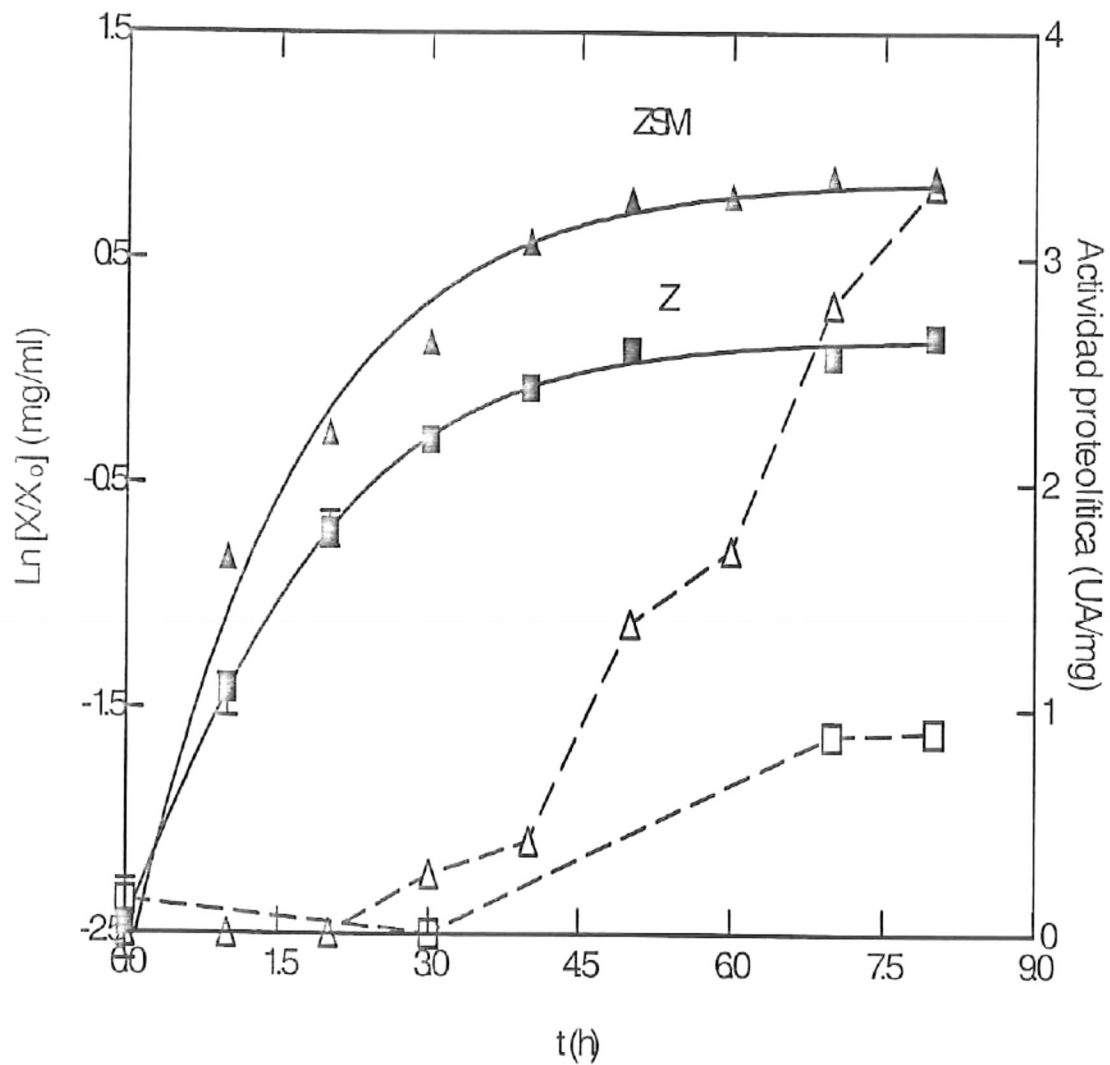


Figura 33. Curva de crecimiento y de producción de actividad proteolítica del cultivo de *Vibrio harveyi* en dos medios de cultivo: Eje principal Y en escala logarítmica, representado en líneas, el medio Z (-■-), y ZSM (-▲-). En eje secundario Y en líneas punteadas Actividad enzimática específica (UA/mg) en SN de Z (-□-), y ZSM (-Δ-).

4.4.5. Efecto del grado de agitación y aireación sobre el cultivo de *Vibrio harveyi*

El efecto de la variación de flujo de aire, fijando el grado de agitación sobre la tasa de crecimiento se muestra en la tabla VII. En la tabla se observa que la mínima μ ($0.049 \pm 0.011 \text{ h}^{-1}$) fue obtenida con 300 rpm y 0.2 vvm de flujo de aire, la máxima μ ($0.507 \pm 0.041 \text{ h}^{-1}$) fue obtenida con 700 rpm y 0.8 vvm de flujo de aire. Las curvas de crecimiento se presentan en la figura 34. La tasa específica de crecimiento en esta cepa se ve afectada principalmente por el grado de agitación suministrado, y no al flujo de aire tal como se aprecia en los datos que se presentan en la Tabla VII.

Tabla VII. Valores de μ (taza específica de crecimiento h^{-1}) a diferentes grados de agitación y aireación.

Agitación Rpm	Aireación (vvm)		
	0.2	0.5	0.8
	$\mu (\text{h}^{-1})$		
300	0.049 ± 0.011	0.126 ± 0.021	0.137 ± 0.020
500	0.400 ± 0.029	0.393 ± 0.033	0.361 ± 0.018
700	0.500 ± 0.031	0.466 ± 0.039	0.507 ± 0.041

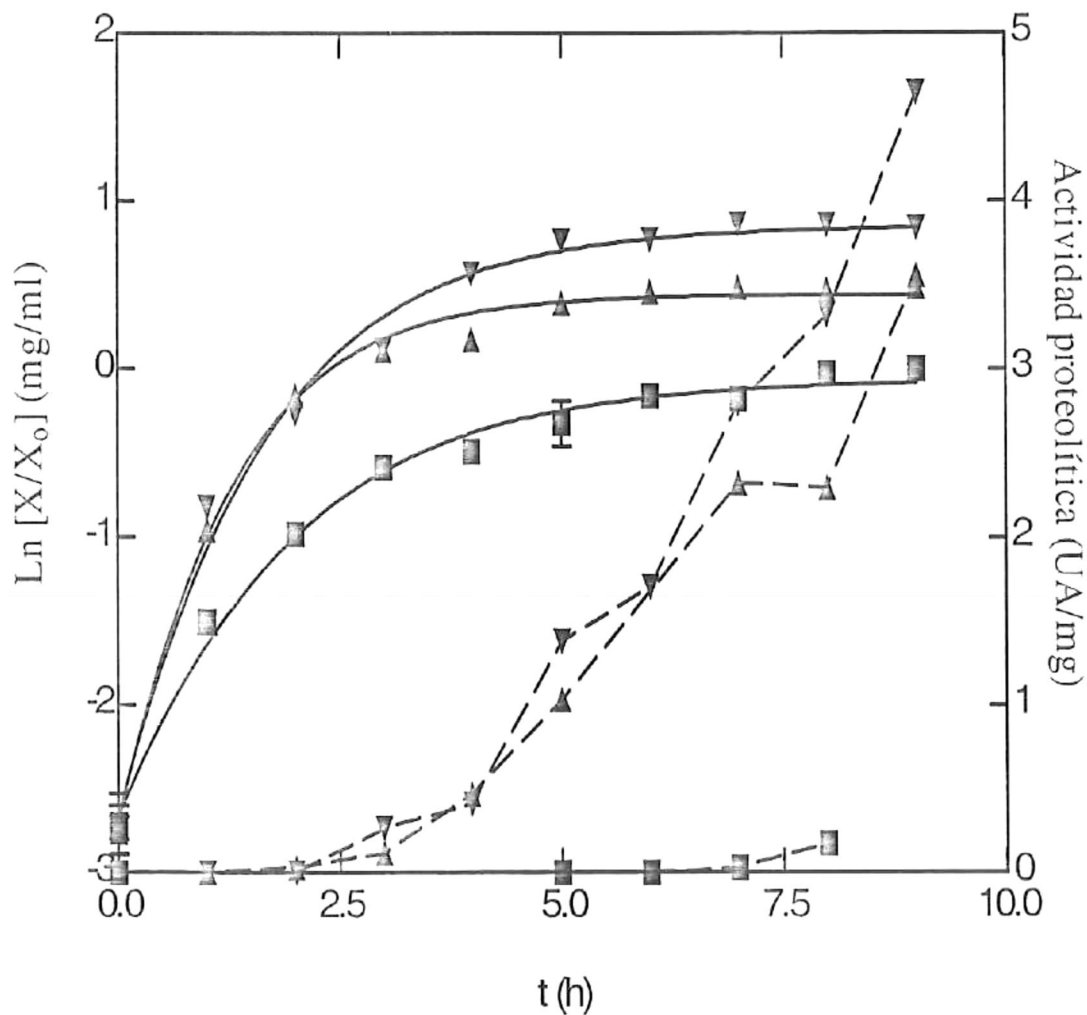


Figura 34. Curva de crecimiento y producción de proteasas de *Vibrio harveyi* ante diferentes grados de agitación y con 0.8 vvm de flujo de aire. Símbolos: 300 (■), 500 rpm (▲), 700 rpm (▼). Las líneas sólidas representan el crecimiento y las líneas punteadas representan la actividad proteolítica.

4.4.6. Determinación del coeficiente de transferencia de masa kLa

Para analizar la influencia del grado de aireación y la agitación sobre el crecimiento y la excreción de enzimas proteolíticas, el coeficiente de transferencia de masa (kLa). Fue determinado bajo diferentes aireaciones y velocidades de agitación usando un método dinámico descrito en metodología (Tabla VIII). Al analizar el coeficiente kLa obtenido utilizando agua de mar se ve incrementado desde 0.254 hasta 1.342 s^{-1} para 300 rpm/0.2 vvm y 700 rpm/0.8 vvm respectivamente. La máxima concentración de oxígeno en el agua de mar fue de 128.8 %, sin embargo la saturación de oxígeno en el agua destilada alcanzó un 153 %. El coeficiente de transferencia no fue diferente significativamente realizándose bajo las mismas condiciones para el agua de mar y el agua fresca (destilada) para este bioreactor. Sin embargo el DO_{max} es diferente, a la concentración de oxígeno disuelto en el agua de mar es suficiente para sostener el crecimiento, indicando que no existe limitación de oxígeno debido a la salinidad del medio de cultivo.

Tabla VIII. K_{La} y DO_{max} (máxima concentración de oxígeno) en agua destilada y agua de mar.

Agitación-Aireación (rpm-vvm)	Agua destilada		Agua de mar	
	K_{La} (s^{-1})	DO_{max} (%)	K_{La} (s^{-1})	DO_{max} (%)
300-0.2	0.232	149.9	0.254	128.8
300-0.5	0.361	151.0	0.343	125.4
300-0.8	0.385	153.9	0.332	119.5
500-0.2	0.351	150.4	0.366	107.6
500-0.5	0.650	149.9	0.609	117.5
500-0.8	0.709	146.1	0.776	120.0
700-0.2	0.545	139.9	0.430	121.5
700-0.5	0.979	150.0	1.071	124.8
700-0.8	1.342	150.3	1.324	126.7

4.4.7. Producción extracelular de proteasas

Se determinó la actividad proteolítica específica durante la curva de crecimiento bajo las condiciones de 300, 500 y 700 rpm, fijando la aireación a un flujo de 0.8 vvm. No fue detectada actividad proteolítica significativa a la condición 300 rpm, sin embargo con 500 y 700 rpm se incrementa significativamente (Fig. 34). Se observó que la concentración de proteína disminuye y la actividad proteolítica específica incrementa al incrementar el grado de agitación (Tabla IX). Las actividades presentadas en la tabla 10, fueron obtenidas a una temperatura de 37°C. El rendimiento de proteína $Y_{p/x}$ disminuye de 0.174 hasta 0.0139 g de proteína / g de biomasa a 300 rpm 0.2 vvm y 700 rpm / 0.8 vvm, respectivamente (Tabla IX). El máximo rendimiento de

proteasas (Yea/x) fue de 80 UA g⁻¹ de biomasa, el cual fue obtenido utilizando las condiciones de 700 rpm y 0.5 vvm de flujo de aire.

Tabla IX. Rendimiento de proteína y actividad proteolítica (UA mg⁻¹) obtenidas en las dos últimas horas de cultivo.

Condicio n Rev min ⁻¹ - vvm	Biomasa mg /mL	Proteína mg / mL	Proteína UA/mg	Yp/x mg proteína /mgbiomas a	Yae/x UA/ mg biomasa	Productivida d UA / mL
300-0.2	0.60 ±0.03	0.105 ±0.003	0.18	0.17	0.031	0.019
300-0.5	0.503±0.04 3	0.082 ±0.011	0.32 ± 0.08	0.16	0.053	0.026 ± 0.003
300-0.8	0.903±0.07 9	0.067 ±0.018	0.10 ± 0.10	0.07	0.008	0.006 ±0.005
500-0.2	1.540±0.09 0	0.046 ±0.003	1.65 ± 0.13	0.03	0.049	0.075 ±0.001
500-0.5	1.757±0.33 2	0.043 ±0.005	2.35 ± 0.37	0.02	0.058	0.101 ±0.029
500-0.8	1.626±0.02 3	0.038 ±0.005	2.31 ± 0.02	0.02	0.054	0.087 ±0.012
700-0.2	1.691±0.61 0	0.029 ±0.001	3.97 ± 0.54	0.02	0.068	0.115 ±0.013
700-0.5	1.765±0.01 8	0.033 ±0.003	4.28 ± 0.94	0.02	0.080	0.138 ±0.018
700-0.8	2.367±0.00 5	0.033 ±0.002	3.06 ± 0.37	0.014	0.043	0.101 ±0.017

V

DISCUSIÓN

Los microorganismos del ambiente marino producen enzimas con actividades y estabilidades enzimáticas propias e inusuales, además presentan diferencias nutricionales a su contraparte terrestre. En esta investigación se encontró un medio que puede inducir la producción de enzimas proteolíticas, similares a estudios reportados por Meigen (1999), quien utilizó triptona como fuente de nitrógeno de manera suplementaria. El proceso de síntesis de proteasas podría estar relacionado a la inducción de genes específicos, entre otros como bioindicadores de cambios fisiológicos celulares y de señalamiento *Quorum-Sensing*, como el fenómeno detectado con la generación de la bioluminiscencia, previa a la síntesis de proteasas.

En este trabajo se seleccionó una cepa bacteriana marina, *Vibrio harveyi* con base en sus características de crecimiento, producción de proteasas e inocuidad de la cepa, que permitió realizar el trabajo en fermentador. Esta cepa presentó bioluminiscencia dependiente de oxígeno, lo cual se midió experimentalmente. La intensidad y duración de los picos de actividad bioluminiscente detectados para esta cepa, fueron de mayores a los reportados por Meighen, (1999), posiblemente influenciado por las condiciones de cultivo y su crecimiento en el bioreactor.

Existen trabajos que demuestran la posibilidad de obtener enzimas proteolíticas de cultivos bacterianos (Lygren *et al.*, 1998), lo cual también se pudo comprobar a nivel bioreactor en este trabajo. En cuanto a las

características de las proteasas, la cepa *Vibrio harveyi* produjo enzimas que resistieron el proceso de liofilización contrario a lo descrito por Lee *et al.*, 1989, para el mismo género bacteriano en donde la enzima fue totalmente inactivada por este proceso.

Las características de las enzimas proteolíticas encontradas también fueron resistentes al uso del detergente SDS a baja concentración, propiedad reportada también en enzimas presentes en el hepatopáncreas de camarón (García-Carreño, et al., 1993). Esta propiedad fue utilizada para poder realizar revelado de actividad proteolítica en geles SDS- PAGE (zymogramas).

Los pesos moleculares obtenidos para las proteasas encontradas fueron de 47, 40 y 35 kDa. Para este mismo género se han reportado proteasas con pesos moleculares de 21, 22, 35 kDa (Lee *et al* 1999, Liu y lee 1999), otras proteasas de tipo cisteínico han sido reportadas en *Vibrio harveyi* del las cepas 820514 y 770527, una de las cuales fue purificada y caracterizada como una sola proteína, con un peso molecular de 38 kDa (lee *et al.* 1999; Liu y Lee 1999). También de la cepa FLA-11 se observó una proteasa, la cual no fue inhibida por PMSF. Otra proteinasa ha sido purificadas de otra cepa de *Vibrio harveyi*, con diferente peso molecular (84 kDa) y presentó 4 unidades de 21 kDa cada una (Fukusawa *et al.* 1988). Las proteasas encontradas en este trabajo presentan diferente mecanismo de acción y pesos moleculares. Los resultados obtenidos y sus diferencias proteicas pueden explicarse por la gran heterogeneidad de las especies *vibrio*, tal como lo describió Vandenberghe *et al.* (1999). Aunque la principal actividad detectada fue la serin-proteasa.

Los estudios de inhibición mostraron la dependencia del extracto crudo a la presencia de iones igual que en otro trabajo (Sanz y Toldrá 2001). La actividad enzimática del *Vibrio harveyi* ATCC 14126 disminuye en presencia de agentes secuestrantes como el EDTA y EGTA, similar a lo reportado por Lee *et al.*, (1997) para el mismo género *Vibrio* pero de otra cepa, sin embargo, estos autores denominaron a la proteasa como metaloproteasa, basándose únicamente en ésta característica. Otros autores denominan a las enzimas presentes en un extracto crudo como del tipo serínico, cuando se utilizan inhibidores como PMSF, DFP y quimostatina (Giménez *et al.*, 2000). Los inhibidores utilizados en los ensayos de este trabajo demostraron que las proteasas presentes son principalmente de tipo serínico debido a que el PMSF inhibió el 96 % de la actividad enzimática, confirmándose con los resultados al utilizarse EDTA y EGTA, ya que estas enzimas por lo general necesitan de los iones calcio para realizar la actividad enzimática. Además, a diferencia con otros autores el mecanismo de acción fue corroborado utilizando sustratos específicos para determinar el mecanismo de acción.

Una característica de las enzimas de cepas halófilas es su requerimiento de sal, Duong y col., (1981) encontraron actividad a 3.6 M y algunas otras con concentraciones del orden de 1 M de NaCl (Giménez *et al.*, 2000). Para esta cepa se encontró que tolera concentraciones de 2.25 M, presentándose un incremento en la inhibición desde 0.5 M en función de la concentración salina.

Sin embargo, la tolerancia a la salinidad de la cepa de estudio no alcanza a las enzimas de una bacteria hipersalina *Natrialba magadii*, cuya actividad disminuye a un 50 % a concentraciones de 2.6 M (Giménez *et al.*, 2000). Una de las aplicaciones de enzimas tolerantes a salinidades altas es en la industria de la fabricación de pieles (Galinski y Tindall, 1992).

Otra característica de las enzimas encontradas fue que su temperatura óptima fue de 50 °C y con sustrato específico 80 °C, por lo que una posible utilización de la enzima deberá considerar procesos en donde la temperatura sea inferior a los 65 °C por ejemplo: Las enzimas de *Natrialba magadii* presentaron una actividad máxima a los 60 °C y a los 70 °C perdieron por completo la actividad enzimática (Giménez *et al.*, 2000). Manachini y Fortina (1998) mencionan que las proteasas son importantes en la industria de los detergentes y en la producción debido a que son activas entre los 50-60 °C, como es presente en el extracto crudo de *V. harveyi*.

La constante de inactivación térmica (E_a) obtenida fue similar a la mostrada por la tripsina y quimiotripsina cristalina (13 kcal/mol), durante la hidrólisis de la caseína (Sumner y Sommers 1947). La estabilidad de esta enzima es superior a la demostrada por *Pseudomonas sp* alcalinas, cuya estabilidad no supera los 35 °C (Duong *et al.*, 1981).

Otros autores como Taguchi *et al.*, (1995) encontraron en el género *Streptomyces* enzimas también del tipo-quimiotripsina la cual presentó

especificidad por el mismo sustrato y pH utilizados en este estudio encontrándose un óptimo de 10 y para la cepa de estudio fue de pH 9.

En cuanto a producción de la biomasa en fermentador, autores como Manachini y Fortina (1998) mostraron el potencial del uso de agua de mar en los procesos de fermentación, como alternativa industrial a aquellos lugares en donde el agua de mar es abundante y pueda ser fuente de otras bacterias marinas útiles. Algunas bacterias requieren hasta de 60 horas para alcanzar la fase estacionaria (Giménez *et al.* 2000). Otras bacterias del género *Bacillus subtilis* no se ha podido realizar fermentaciones exitosas, ya que se ha obtenido buena producción de biomasa, sin embargo la producción de enzimas no fue detectada. Las condiciones hidrodinámicas en este trabajo afectaron la producción de biomasa y de actividad enzimática. La tasa específica de crecimiento en esta cepa se ve afectada principalmente por las condiciones hidrodinámicas del fermentador, determinadas por la agitación y aireación.

VI

CONCLUSIONES

1. La bacteria seleccionada en este trabajo fue capaz de producir proteasas en un fermentador. *Vibrio harveyi* fue seleccionado como productor de proteasas debido a su alta actividad enzimática y a la no patogenicidad de la cepa. El medio de cultivo afectó la producción de proteasas.
2. El estudio del mecanismo de acción de las enzimas de *Vibrio harveyi* fueron clasificadas como serin-proteasas con actividad quimiotripsina. Los pesos moleculares de las proteasas fueron de 47, 40 y 35 kDa.
3. El pH óptimo de la enzima fue alcalino y las enzimas mesófilas-termófilas y se obtuvieron los valores de V_{max} 0.25 min⁻¹ y K_m 0.93 mM
4. Las condiciones hidrodinámicas del bioreactor afectan sobre la producción de proteasas, principalmente el grado de agitación. Además de observar efecto favorable con la adición del "skim milk"

LITERATURA CITADA

Introducción

- Austin, B. 1992. Marine Microbiology. Cambridge University Press, New York, pp. 172-173.
- Banerjee, R. y B.C. Bhattacharyya. 1993. Kinetic properties of extracellular alkaline proteases of *Rhizopus oryzae*. J. Ferment. Bioeng. 75: 380-382
- Bayouhd, A., N. Gharsallah, M. Chamkha, A. Dhouib S. Ammar y M. Nasri. 2000. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24: 291-295.
- Bhosale, SH., MB. Rao, VV. Deshpande y Srinivasan. 1995. Thermo-stability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). Enzyme Microb. Technol. 17: 136-139.
- Chakrabarti, SK., N. Matsumura y RS. Ranu. 2000. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). Curr. Microbiol. 40: 239-244.
- Chandrasekaran, M. 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. Journal Marine Biotechnology. 5: 86-89.
- Cliffe, K. 1996. En: Biotecnología para Ingenieros Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos Ed. Limusa, Scragg Alan.
- Croxatto, A., V. Chalker, J. Lauritz, J. Jass, A. Hardman, P. Williams, M. Cámara y D. Milton. 2002. Van T, a homologue of *Vibrio harveyi* lux R, regulates serine, metalloprotease, pigment and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. Journal of Bacteriology. 184 (6): 1617-1629.
- Duong, V., U. Simudu y N. Taga. 1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. Can. J. Microbiology. 27(5): 505-510.
- Durham, D., D. Fortney, y L.B. Nanney. 1993. Preliminary evaluation of vibrinolysin, a novel proteolytic enzyme composition suitable for the debridement of burn wound eschar. J. Burn Care Rehabil. 14(5): 544-551.

- Ellis, A.E., A. Vale, T.J. Bowden, K. Thompson y T.S. Hastings. 1997. In vivo production of A-protein, lipolysaccharide, iron-regulated outer membrane proteins and 70-kDa serine protease by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. FEMS Microbiology Letters. 149: 157-163.
- Farell, D.H., y J.H. Crosa. 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. Biochemistry. 30(14): 3432-3436.
- Fukuda, K., K. Hasuda, T. Oda, H. Yoshimura y T. Marumatsu. 1997. Novel extracellular alkaline metalloendopeptidases from *Vibrio* sp. NUF-BPP1: purification and characterization. Biosci Biotechnol Biochem. 61(1): 96-101.
- Godfrey, T. y S. West. 1996. Introduction to Industrial Enzymology. En: Industrial Enzymology. Godfrey, T., S. West. Stockton press. 3:8
- Gupta, R., Q. Beg y B. Chauhan. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 381-395.
- Gupta, R., Q. K. Beg y P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15-32.
- Greene, R.V., H.L. Griffin y M.A. Cotta. 1996. Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications. Biotechnology Letters. 18(7): 759-764
- Kalisz, H.M. 1988. Microbial proteinases. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36:1-65
- Kevin, H. L. y V. Hatzimanikatis. 2002. Biochemical engineering. Current opinión in Biotechnology. 13:85-86.
- Kumar, C.G. y H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnol. Adv. 17:561-594
- Lygren, B., E.F. Pettersen, H.I. Wergeland y C. Endresen. 1998. An extracellular low molecular weight protease with activity against gelatin and casein

- produced earlier during growth of *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* that the serine protease. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 18(3): 96-101.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, y J. Parker. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall Iberia. Madrid. 8a Ed. Pp. 74-175, 452, 532-605.
- Makino, K., T. Koshikawa, T. Nishihara, T. Ichikawa y M. Kondo. 1981. Studies on protease from marine bacteria. 1 Isolation of marine *Pseudomonas* sp. 145-2 and purification of protease. Microbios. 31(124): 103-112.
- Manachini, P.L. y M.G. Fortina. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters. 20(6): 565-568.
- Miura, Y. 1976. En: Ghose T.K. (ed.), Adv. Biochem. Eng., Vol 4, Springer-Verlag. Berlín.
- Moreno, M. y M. Landgraf. 1998. Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. Journal of Applied Microbiology. 84(5): 747-751.
- Namikoshim, M. y K. Rinehart. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 17(5-6): 373-384.
- Ogino, H., F. Watanabe, M. Yamada, S. Nakagawa, T. Hirose, A. Noguchi, M. Yasuda, H. y Ishikawa. 1999. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. J. Biosci. Bioeng. 87: 61-68.
- Oppenheimer, C.H. y C.E. Zobell. 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. Journal of marine research. 11: 10-18.
- Petinate, S., M. Branquinho, R. Coelho, A. Vértelo y S. DeSimone. 1999. Purification and partial characterization of an extracellular serine-

- proteinase of *Streptomyces cynaeus* isolated from Brazilian cerrado soil. J. Appl. Microbiol. 87: 557-563.
- Pinn, E. H., A. Rogerson y R.J. Atkinson. 1997. Microbial flora associated with the digestive system of *Upogebia stellata* (crustacea: decapoda: thalassinidea). Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom. 77(4): 1083-1096.
- Poza, M., T. Miguel, C. Sieiro y T. G. Villa. 2001. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. J. Appl. Microbiol. 91: 916-921.
- Rajamani, S., y A. Hilda. 1987. Plate assay to screen fungi for proteolytic activity. Curr. Sci. 56: 1179-1181.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge. y V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews. 62(3): 597-635.
- Takenaka, S. y M. Watanabe. 1997. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. Chemosphere. 34(4): 749-57.
- Toranzo, A.E. y J.L. Barja. 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. Annu. Rev. Fish. Dis. 3: 5-36.
- Wang, D. I, C.L. Cooney, A. Demain, P. Dunhill, A.E., Humphrey y M. D. Lilly. 1979. Fermentation and Enzyme Technology, John Wiley and Sons, New York.
- Wiklund, T. e I. Dalsgaard. 1998. Occurrence and significance of a typical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. Dis Aquat Organ. 32(1): 46-69.

Antecedentes

- Chandrasekaran, M. 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. Journal Marine Biotechnology. 5: 86-89.

- David, V., A. Deuth, A. Sloma, D. Pawlyk, A. Ally y D. Durham. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin of *Vibrio proteolyticus*. *Gene*. 112(1): 107-112.
- Denkin, S. y D. Nelson. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Applied Environ Microbiology*. 65(8): 3555-3560.
- Dib, R., J. Chobert, M. Dalgalarondo, G. Barbier y T. Haertle. 1997. Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcus abyssi*, strain st 549, hiperthermophilic archae from deep-sea hydrothermoal ecosystem. *FEBS Letters*. 431(2): 279-284.
- Duong, V., U. Simudu y N. Taga. 1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. *Can. J. Microbiology*. 27(5): 505-510.
- Durham, D., D. Fortney, y L.B. Nanney. 1993. Preliminary evaluation of vibriolysin, a novel proteolytic enzyme composition suitable for the debridement of burn wound eschar. *J. Burn Care Rehabil*. 14(5): 544-551.
- Ellis, A.E., A. Vale, T.J. Bowden, K. Thompson y T.S. Hastings. 1997. In vivo production of A-protein, lipopolysaccharide, iron-regulated outer membrane proteins and 70-kDa serine protease by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *FEMS Microbiology. Letters*. 149: 157-163.
- Farell, D.H. y J.H. Crosa. 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry*. 30(14): 3432-3436.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, A. Kamii, Y. Ohyama, y M. Osumi. 1988. Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11. *Agricul. Biol. Chem*. 52: 435-441.
- Fukuda, K., K. Hasuda, T. Oda, H. Yoshimura y T. Marumatsu. 1997. Novel extracellular alkaline metalloendopeptidases from *Vibrio* sp. NUF-BPP1:

- purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61(1): 96-101.
- Giménez, M., C. Studdert, J. Sánchez y R. De Castro. 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification biochemical characterization. *Extremophiles.* 4, 181-188.
- Harris, L., L. Owens y Smith S. 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3548- 3550.
- Harwood, V.J., J.D. Denson, K.A. Robinson-Bidle y H.J Schreier. 1997. Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic Archeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology.* 179(11): 3613-3618.
- Ichige, A., K. Oishi, y S. Mizushima. 1988. Isolation and characterization of mutants of a marine *Vibrio* strain that are defective in production of extracellular proteins. *Journal of Bacteriology.* 170(8): 3537-3542.
- Jayabalan, N. y D. Pillai. 1994. *Penaeid prawns* and associated luminous bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 41: 415-421.
- Kohlmann, K. L., S. S. Nielsen, L. R. Steenson y M. R. Ladisch. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 74: 3275-3283.
- Lee, K., P. Liu, G. Kou y S. Chan. 1997. Investigation on the mayor exotoxin of *Vibrio harvey* 770527 isolated from diseased *Panaeus monodon*. *Reports on Fish Disease Research.* 0(18):33-44.
- Lee, K. K., P. C. Liu, y Y. L. Chen. 1999. Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio Harvey*. *Electrophoresis.* 20: 3343-3346.
- Liu, P. C. y K. K. Lee. 1999. *Lett. Appl. Microbiol.* Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. 28: 428-430.

- Lygren, B., E.F. Pettersen, H.I. Wergeland y C. Endresen. 1998. An extracellular low molecular weight protease with activity against gelatin and casein produced earlier during growth of *Aeromonas salmonicida* spp. *Aeromonas salmonicida* than the serine protease. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 18(3): 96-101.
- Manachini, P.L. y M.G. Fortina. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters. 20(6): 565-568.
- Makarios-Laham, I. 1990. Studies on the obligately psychrophilic vibrios of fish origin and characteristics of their proteases. DISS. ABST. INT. PT. B. SCI. and ENG. 51(1): 118.
- Makino, K., T. Koshikawa, T. Nishihara, T. Ichikawa y M. Kondo. 1981. Studies on protease from marine bacteria. 1 Isolation of marine *Pseudomonas* sp. 145-2 and purification of protease. Microbios. 31(124): 103-112.
- Obata, H., A. Sugiyama, H. Kawahara y T. Maramatsu. 1997. Purification and properties of a aminopeptidase from a protamine-degrading marine bacterium. Biosci Biotechnol. Biochem. 61(7): 1102-1108.
- Popovic, M., H. Niebelschutz, y M. Reuss M. 1979. Oxygen solubility in fermentation fluids. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8 :1.
- Simon, L. y M. N. Karim. 2001. Identification and Control of Dissolved Oxygen in Hybridoma Cell cultured in a shear sensitive environment. Biotechnol. Progress. 17(4): 634-642.
- Tsujibo, H., K. Miyamoto, K. Tanaka, Y. Kaidzu, C. Imada, Y. Okami y Y. Inamori. 1996. Cloning and sequence analysis of protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas* sp. strain 0-7. Biosci Biotechnol Biochem. 60(8): 1284-1288.
- Turkiewicz, M., E. Gromek, K. Halina y M. Zielinska. 1999. Biosynthesis y properties of an extracellular metalloprotease from the antarctic marine

bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. Journal of Biotechnology. 70(1-3): 53-60.

- Wiersma, M., G. Versteegh, H.A. Assink, G.W. Welling y W. Harder. 1978. Purification and some properties of two extracellular proteolytic enzymes produced by *Vibrio* SA1. Antonie Van Leeuwenhoek. 44(2): 157-169.
- Yuguo, Z., W. Zhao, C. Xiaolong y Z. Chunhua. 2001. Production of extracellular protease from crude substrates with dregs in an external-loop airlift bioreactor with lower ratio of height to diameter. Biotechnol. Prog. 2001 17: 273-277.

Materiales y Métodos

- Beynon, R. y J. Bond. 2001. Proteolytic Enzymes, 2ed: A Practical Approach. Ed. Oxford. ISBN. 019963663X.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochemistry. 72: 248-254.
- Dimes, L.E., F.L. García-Carreño y N.F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility 3. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. Comparative Biochemistry Physiology. 109:349-360.
- Erlanger, B.F., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The propagation and properties of two new chromatogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophysics. 95: 271-278.
- García-Carreño, F.L, M.P. Hernández-Cortes y N.F. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 1456-1461.
- García-Carreño, F.L. y M.A. Navarrete. 1997. Classification of proteases without tears. Biochemical Education. 25(3): 161-168.

- García-Carreño, F.L. y N.F. Haard. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.
- García-Carreño, F.L., L.E. Dimes y N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- Ilyina, A. D., F. R. Cerda, B. C. Estrada, A. F. Dukhovich, L. J. Gaona, G. Garza, y M. J. Rodríguez. 1998. Sistema bioluminiscente luciferina luciferasa de las luciérnagas Parte 1: propiedades bioquímicas y catalíticas de la enzima luciferasa. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 42: 99-108.
- Kohlmann, K. L., S. S. Nielsen, L. R. Steenson y M. R. Ladisch. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 74: 3275-3283.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Rosenberg, I. M. 1996. Protein analysis and purification. *Benchtop Techniques.* Birhauser Press Boston, USA. 93-94.
- Sizemore, RK. y L.H. Stevenson. 1970. Method for the Isolation of Proteolytic Marine Bacteria. *Applied Microbiology.* 20(6): 991-992.
- Wang, D. I. C., Cooney C.L., Demain, A., Dunhill, P., Humphrey, A.E. y Lilly M. D. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley and Sons. New York.



Effect of agitation rate on biomass and protease production by a marine bacterium *Vibrio harveyi* cultured in a fermentor

César Estrada-Badillo¹ and Facundo J. Márquez-Rocha^{2,*†}

¹Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Mexico

²Departamento de Biotecnología Marina, CICESE, Baja California 22860, México

*Author for correspondence: Tel.: +52-646-1745050 ext. 24458, Fax: +52-646-1750534,

E-mail: fmarquez@cicese.mx

†Mailing address: P.O. BOX 434844, San Diego, CA 92143-4844, USA

Received 29 March 2002; accepted 17 September 2002

Keywords: Extracellular proteases, hydrodynamic conditions, marine bacteria, marine fermentation

Summary

A marine bacterium *Vibrio harveyi* was adapted to grow and produce extracellular proteases in a seawater-Zobell-based medium, supplemented with skim milk under different hydrodynamic conditions, namely agitation and aeration rates. The addition of skim milk to Zobell medium enhanced fivefold the extracellular enzyme production. Protease production seemed to take place after maximum luminescence had been produced. Specific growth rate increased as a consequence of increasing agitation rates. The maximum activity of 4.28 units mg⁻¹ protein were formed with 700 rev min⁻¹ and 0.5 v v m. Protease activity detected has a molecular weight of 34 kDa. Another minor band of protease activity was found at 40 kDa.

Introduction

Vibrio harveyi is a ubiquitous luminous bacterium in warm marine waters and part of the intestinal flora of marine animals (Harris *et al.* 1996). Luminous bacteria occur as freeliving, saprophytic, symbiotic and parasitic forms (Jayabalan & Pillai 1994).

Proteases with molecular weights of 22 and 38 kDa were purified and partially characterized from the marine bacterial species strains 770527 and 820514 (Lee *et al.* 1999; Liu & Lee 1999). Other marine strains produce metal-chelator-sensitive alkaline proteases (Fukasawa *et al.* 1988).

Alkaline proteases are particularly important as they are extensively used in laundry detergents and leather production because they are stable and active above 50–60 °C, at high pH values and in presence of surfactants, sequestering agents and bleaches. There is a need to develop new detergent formulations either for environmental, specific activity or energetic considerations. These are important facts promoting the development of new proteases and other types of enzymes used to produce detergents (Manachini & Fortina 1998).

Control of dissolved oxygen tension in bacterial cell fermentations involves the manipulation of the agitation speed and the gas supply rate in order to optimize the volumetric mass transfer coefficient k_{La} . This approach gives satisfactory results since the mass transfer coefficient

k_{La} is a function of the power dissipation by impeller per unit volume. The concentration of dissolved oxygen may be controlled by manipulating the partial oxygen pressure in the liquid phase and keeping the gas flow rate and stirring rate constant in the bioreactor (Simon & Karim 2001).

The salinity of the broth, air flow rate, and stirring speed have an effect on the oxygen transfer rate, degree of turbulence, and broth circulation velocity, with an influence on biomass concentration, enzyme productivity, and substrate consumption (Popovic *et al.* 1979).

Although microbes from terrestrial sources are employed for industrial production of enzymes, the potential for synthesis of several novel enzymes by marine microorganisms has been recognized (Chandrasekaran 1997). Diverse techniques have been used for the screening of novel enzymes with new biocatalytic capabilities and great potential for several industrial processes and other applications (Manachini & Fortina 1998), such as restriction endonucleases (Roberts 1985). However, despite the commercial importance of these enzymes, there are no reports of quantitative assessment of biomass and protease production of marine bacteria in a bioreactor.

The present work describes the effect of hydrodynamic conditions on the growth and protease production of *Vibrio harveyi*, grown in a jar fermentor.

Materials and methods

Culture media and bacterial strain

Vibrio harveyi (ATCC 14126 is classified as a bio-safety level I microorganism) maintained in Bacto-marine agar, was grown in two culture media, Zobell (Z) medium and Zobell medium supplemented with 2.5 g l^{-1} of skim milk (ZSM). Seawater (salinity 26‰) was used to prepare both media.

Inoculum preparation

A colony of *V. harveyi* was grown for 24 h in Bacto-marine agar and was inoculated into a 100 ml-Erlenmeyer flask containing 30 ml of Zobell medium, it was incubated at 30 °C, 300 rev min⁻¹ in an orbital shaker, for 4 h. Five millilitre of this culture was inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask with a 50 ml of Zobell medium. The culture was allowed to reach an OD_{600 nm} of 2.0. Two flasks were used as inoculum for fermentor experiments.

Bioreactor description and culture condition

A 1.5 l jar-fermentor (Applikon, Holland) with a 1 l working volume was operated in batch culture mode. The fermentor is equipped with two Rushton disc turbines (4.5 cm diameter), separated 2.5 cm from the bottom of the vessel, 11.44 from the top, and 4.0 cm between them. The fermentor contained two baffles (10 cm long and 1 cm wide), separated by 5.4 cm. Air supply was provided through a metallic tube with seven holes of 0.9 mm of diameter, fixed at 2.0 cm from the bottom. Three agitation speeds: 300, 500, and 700 rev min⁻¹ and three air flow rates: 0.2, 0.5 and 0.8 v/v/m were used. Temperature was kept at 30 °C and the initial pH was 7.2 ± 0.1 . Foam was controlled by adding a few drops of sterilized sunflower oil.

Bacterial growth determination

The bacterial growth was estimated by optical density at 600 nm (Hatch spectrophotometer DR.4000) and by dry weight determination at 60 °C overnight, using three replicates. The growth curve was defined as the logarithm of the biomass size [$y = \ln(X/X_0)$] as a function of time (t), μ determined by Gompertz model:

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu e}{A} (\lambda - t) - 1 \right] \right\},$$

where μ is the specific growth rate, λ the lag time and the asymptote A .

Protein determination

Protein was determined by using BioRad dye reagent and bovine serum albumin as standard.

Proteolytic activity determination

Enzyme production was monitored along the time course of the culture. Aliquots from the supernatant (crude extract) obtained by centrifugation of the culture broth at $16,000 \times g$ per 5 min were used for the determinations. The proteolytic activity was assayed using azocasein as the substrate, as described by Köhlmann *et al.* (1991). One-millilitre reaction mix contained Tris-HCl buffer 50 mM pH 7.5, 1% azocasein and 1.7 μg of protein from crude extract. Reaction was carried out at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by the addition of 0.5 ml 20% TCA. The change of absorbance in the supernatant was monitored at 366 nm. Substrate controls (with crude extract) were stopped by the addition of 20% TCA. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to produce an increase in absorbance of one unit at 366 nm in a minute. The assays were performed in duplicate.

SDS-PAGE Zymograms

Vertical minigel electrophoresis was carried out with 12% polyacrylamide as separating gel, and 4% as casting gel. The running buffer was Tris/Glycine at pH 8.3, with 0.1% SDS. The electrophoresis was conducted with a constant electrical input of 20 mA. The SDS sample buffer contained 12.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.06% bromophenol blue, 20% glycerol. A BioRad broad range pre-stained molecular weight marker was used to determine the molecular weight. Zymogram for proteolytic activity was carried out as described by Rosenberg (1996), at 37 °C to allow casein digestion. The quantity of protein loaded was 1.7 μg of protein.

Bioluminescence determination

The intensity of the bioluminescence was monitored using a luminometer (Emlite, Russian Federation), from direct measurements of 1 ml of culture. Bioluminescence was carried out without activators (Ilyina *et al.* 1998).

k_{La} determination

The measurement of the mass transfer coefficient (k_{La}) for oxygen was carried out by the indirect method, by determined dissolved oxygen concentration after initial DO was zero. An oxygen electrode probe was used to measured oxygen during the time. Following equation was used to calculate k_{La} .

$$Na = dC_L/dt = k_{La}(C_E - C_L)$$

Reagents

Culture media were from Difco (Sparks, MD, USA) and the rest of reagents from Sigma (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA).

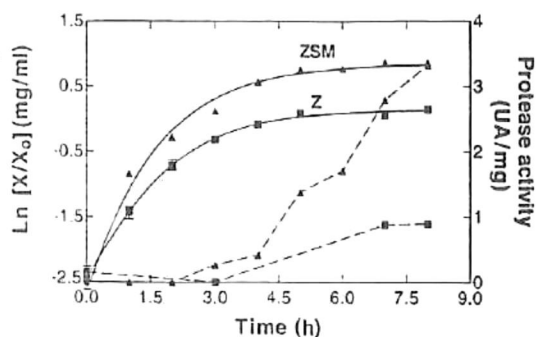


Figure 1. Time course of the growth and protease production of *Vibrio harveyi* in Z (■) and ZSM (▲) media. Solid lines represent growth and dashed lines represent protease activity.

Results and discussion

Influence of the culture media composition on growth and protease production

Vibrio harveyi showed rapid growth in both Z and ZSM media. The specific growth rate (μ) at 700 rev min⁻¹ and 0.8 v/v m aeration rate was 0.297 ± 0.036 h⁻¹ in Z medium and 0.523 ± 0.027 h⁻¹ in ZSM medium. Final biomass concentration was 1.49 and 2.37 mg ml⁻¹ for Z and ZSM media, respectively (Figure 1). Protease activity appeared after 3 h cultivation, increasing more than four times after bioluminescence has reached a maximum (Figure 2). Protease production at the eighth hour of cultivation was 0.06 and 4.65 activity units in Z and ZSM media, respectively.

Effect of aeration and agitation rate

The effect of varying air flow rates, fixing one agitation rate at the time on the growth rate is summarized in Table 1. Minimum μ (0.049 ± 0.011 h⁻¹) was obtained at 300 rev min⁻¹ and 0.2 v/v m aeration rate, maximum μ (0.507 ± 0.041 h⁻¹) was obtained at 700 rev min⁻¹ and 0.8 v/v m. The specific growth rate in this strain seems to be affected mainly by agitation rate (Table 1).

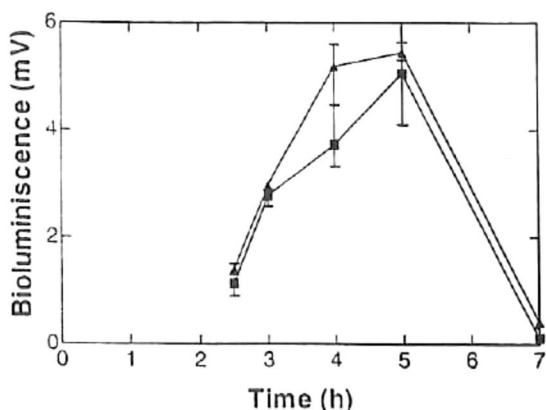


Figure 2. Time course of the bioluminescence during growth of *Vibrio harveyi* with Z (■) and ZSM media (▲).

Table 1. Values of specific growth rate (μ h⁻¹) at different agitation and aeration rates.

Agitation (rev min ⁻¹)	Aeration (v/v/m)		
	0.2	0.5	0.8
300	0.049 ± 0.011	0.126 ± 0.021	0.137 ± 0.020
500	0.400 ± 0.029	0.393 ± 0.033	0.361 ± 0.018
700	0.500 ± 0.031	0.466 ± 0.039	0.507 ± 0.041

Table 2. $k_L a$ and DO_{max} (maximum oxygen concentration) in fresh and marine water.

Agitation-Aeration (rev min ⁻¹ -v/v/m)	Freshwater		Seawater	
	$k_L a$ (s ⁻¹)	DO _{max} (%)	$k_L a$ (s ⁻¹)	DO _{max} (%)
300-0.2	0.232	149.9	0.254	128.8
300-0.5	0.361	151.0	0.343	125.4
300-0.8	0.385	153.9	0.332	119.5
500-0.2	0.351	150.4	0.366	107.6
500-0.5	0.650	149.9	0.609	117.5
500-0.8	0.709	146.1	0.776	120.0
700-0.2	0.545	139.9	0.430	121.5
700-0.5	0.979	150.0	1.071	124.8
700-0.8	1.342	150.3	1.324	126.7

Oxygen mass transfer rates

In order to analyse the influence of aeration and agitation rates on the growth and protease formation, the oxygen mass transfer coefficient $k_L a$ was determined for different aeration and agitation rates using the dynamic method (Table 2). The coefficient $k_L a$ in seawater increased from 0.254 to 1.342 s⁻¹ for 300 rev min⁻¹/0.2 v/v m and 700 rev min⁻¹/0.8 v/v m, respectively. The maximum oxygen concentration in seawater was 128.8%, whereas oxygen saturation with freshwater reached to 153%. Transfer coefficient was not significantly different comparing the same conditions for fresh and seawater in this bioreactor. Although DO_{max} is different, the oxygen concentration in seawater is

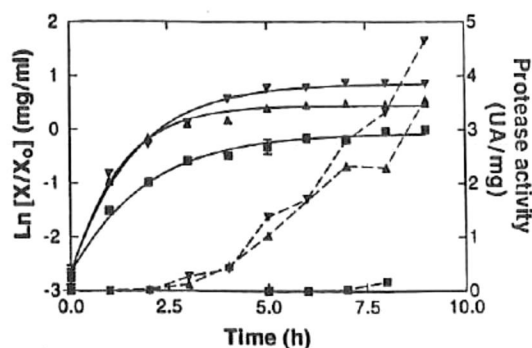


Figure 3. Time course of growth and protease production of *Vibrio harveyi* at different stirring rates and 0.8 v/v m aeration rate. Symbols: 300 (■), 500 rev min⁻¹ (▲), 700 rev min⁻¹ (▼). Solid lines represent growth and dashed lines represent protease activity.

Table 3. Yields of protein and protease activity (UA mg⁻¹) obtained in the last 2 h of cultivation.

Condition rev min ⁻¹ v/v m	Biomass (mg ml ⁻¹)	Protein (mg ml ⁻¹)	Protein (UA mg ⁻¹)	$Y_{p/x}$ (mg protein mg ⁻¹ biomass)	$Y_{ca/x}$ (UA mg ⁻¹ biomass)	Productivity (UA ml ⁻¹)
300 0.2	0.60 ± 0.03	0.105 ± 0.003	0.18	0.17	0.031	0.019
300 0.5	0.50 ± 0.04	0.082 ± 0.011	0.32 ± 0.08	0.16	0.053	0.026 ± 0.003
300 0.8	0.90 ± 0.08	0.067 ± 0.018	0.10 ± 0.10	0.07	0.008	0.006 ± 0.005
500 0.2	1.54 ± 0.09	0.046 ± 0.003	1.65 ± 0.13	0.03	0.049	0.075 ± 0.001
500 0.5	1.76 ± 0.33	0.043 ± 0.005	2.35 ± 0.37	0.02	0.058	0.101 ± 0.029
500 0.8	1.63 ± 0.02	0.038 ± 0.005	2.31 ± 0.021	0.02	0.054	0.087 ± 0.012
700 0.2	1.69 ± 0.61	0.029 ± 0.001	3.97 ± 0.54	0.02	0.068	0.115 ± 0.013
700 0.5	1.77 ± 0.02	0.033 ± 0.003	4.28 ± 0.94	0.02	0.080	0.138 ± 0.018
700 0.8	2.37 ± 0.01	0.033 ± 0.002	3.06 ± 0.37	0.014	0.043	0.101 ± 0.017

enough to support growth, indicating that no oxygen limitation occurs due to the salinity of the medium.

Extracellular protease production

Protease specific activity was determined during growth time course under 300, 500 and 700 rev min⁻¹, fixing aeration to 0.8 v/v m. No significant amount of activity was detected at 300 rev min⁻¹, whereas at 500 and 700 rev min⁻¹ it increased significantly (Figure 3). Protein concentration decreased and protease specific activity increased by increasing agitation rate (Table 3). Protein yield $Y_{p/x}$ decreased from 0.174 to 0.0139 g protein g biomass at 300 rev min⁻¹/0.2 v/v m and 700 rev min⁻¹ 0.8 v/v m, respectively (Table 3). Protease maximum yield ($Y_{ca/x}$) was 80 UA g⁻¹ biomass, which was obtained at the 700 rev min⁻¹ and 0.5 v/v m condition.

Determination of the protease molecular weight

The main protease activity produced had a molecular weight of approximately 34 kDa (Figure 4). This enzyme seems to be induced by the addition of skim milk

to the medium. Another band of activity was detected at 40 kDa. In a different work (Lee *et al.* 1999), a protease from *Vibrio harveyi* strains 820514 and 770527 has been purified and characterized as a single protein band detected of 38 kDa in SDS-PAGE electrophoresis, and identified as a cysteine protease. In this work, a major band at 34 kDa and a minor band of 40 kDa were identified. This result might be explained by the great heterogeneity of *Vibrio* species (Vandenberghe *et al.* 1999). Other proteinases have been purified from different strains of *Vibrio harveyi*, with different molecular weights, for example 84 kDa, which contain four units with 21 kDa each (Fukasawa *et al.* 1988).

With these results it can be concluded that marine bacteria can be used for enzyme production, in the same way as other bacteria from terrestrial sources. However, additional studies on the kinetic properties of these enzymes and selection of inducers for protease formation should be done. Some novel kinetic characteristics of our enzyme seems to be very promising for industrial uses.

Acknowledgements

Cesar Estrada Badillo is a fellow of CONACYT no. 113533. The project was supported by an Internal Grant of CICESE, no. 625105. We wish to thank Dr. Leonardo Lizarraga and Dra. Ilyina for the use of some equipment.

References

- Chandrasekaran, M. 1997 Industrial enzymes from marine microorganisms: the Indian scenario. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 86–89.
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Kumii, A., Ohshima, Y. & Osumi, M. 1988 Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 435–441.
- Harris, L., Owens, L. & Smith, S. 1996 A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3548–3550.
- Ilyina, A.D., Cerda, F.R., Estrada, B.C., Dukhovich, A.F., Gaona, L.J.G., Garza, G.Y. & Rodriguez, M.J. 1998 Sistema bioluminiscente luciferina luciferasa de las luciérnagas Parte I: propiedades bioquímicas y catalíticas de la enzima luciferasa. *Revista de la Sociedad Química de México* 42, 99–108.

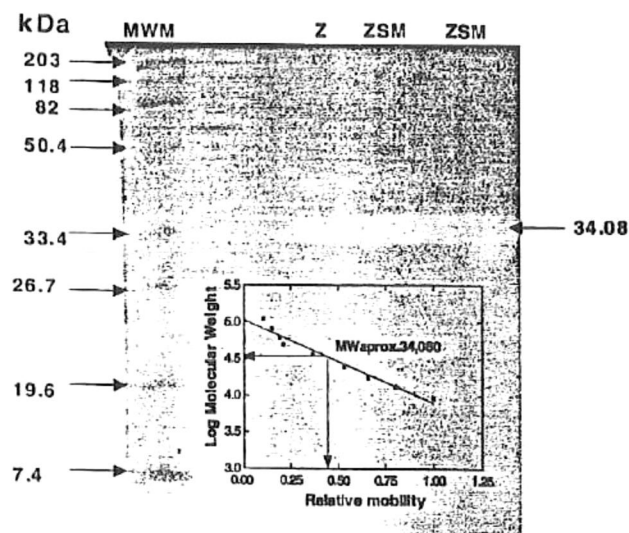


Figure 4. Zymograms of protease activity detected in the cell-free broth.