



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

Optimización de la actividad proteolítica de *Bacillus sp.*, aislados de suelo de cultivo en Huacho - Perú

Tesis

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biotecnología

Autor

Nestor Manuel Quiche Salvador

Asesora

Blga. Hermila Belba Diaz Pillasca

Huacho – Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

(Resolución De Consejo Directivo N°012 – 2020 – SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

INFORMACIÓN

| DATOS DEL AUTOR: | | |
|--|------------|------------------------------|
| NOMBRES Y APELLIDOS | DNI | FECHA DE SUSTENTACIÓN |
| Nestor Manuel Quiche Salvador | 72491970 | 18/03/2024 |
| DATOS DEL ASESOR: | | |
| NOMBRES Y APELLIDOS | DNI | CODIGO ORCID |
| Blga. Hermila Belba Diaz Pillasca | 15601607 | 0000-0002-2491-3774 |
| DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS – PREGRADO/ POSGRADO-MAESTRIA-DOCTORADO: | | |
| NOMBRES Y APELLIDOS | DNI | CODIGO ORCID |
| Dr. Francisco Castillo More | 15589942 | 0009-0005-8777-7764 |
| Blgo. Luis Alberto La Cruz Arévalo | 15612160 | 0009-0009-4576-5107 |
| Mo. Ronnel Edgar Bazán Bautista | 18010195 | 0000-0003-0349-6462 |

Optimización de la actividad proteolítica de cepas de *Bacillus* sp., aislados de suelo de cultivo en Huacho - Perú

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

1%

★ biblioteca.ulasamericas.edu.pe

Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 10 words

Excluir bibliografía

Apagado

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
Escuela Profesional De Biología Con Mención En Biotecnología**



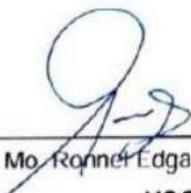
TESIS

**Optimización de la actividad proteolítica de *Bacillus sp.*, aislados de
suelo de cultivo en Huacho - Perú**

Miembros Del Jurado Evaluador:


Dr. Francisco Castillo More
PRESIDENTE


Bigo. Luis Alberto la Cruz Arévalo
SECRETARIO


Mo. Ronnel Edgar Bazán Bautista
VOCAL


Biga. Nermila Diaz pillasca
ASESORA

Huacho – Perú

2024

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres (uno me apoya desde el cielo) y hermanas, personas que han respaldado mi trayectoria académica de manera incondicional a lo largo de mis estudios universitarios; no habría llegado a este punto sin ellos. Gracias por su motivación constante que me mantiene adelante incluso cuando las cosas se ponen difíciles durante el transcurso del camino.

Agradecimiento

Agradecer principalmente a mi madre Florentina Salvador grados, quien desde el inicio de mi carrera me apoyo siempre. También agradecer al Blgo. Dr. José Luis Romero Bozzetta quien fue mi asesor, por la experiencia, conocimientos y habilidades que contribuyeron al éxito de este proyecto. Finalmente quisiera agradecer a mi Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión por permitir desarrollarme como profesional y buen estudiante durante este tiempo. Gracias a todos los que han contribuido a este trabajo y a mi crecimiento profesional como resultado, y lo más importante, gracias por permitirme contribuir a la ciencia de nuestro país.

Índice

| | |
|---|------|
| Dedicatoria..... | I |
| Agradecimiento..... | II |
| Índice | III |
| Índice de tablas | VI |
| Índice de figuras | VII |
| Resumen | VIII |
| Abstract..... | X |
| Introducción | 1 |
| Capítulo I. Planteamiento del problema | 3 |
| 1.1 Descripción de la realidad problemática | 3 |
| 1.2 Formulación del problema | 3 |
| 1.2.1 Problema general | 3 |
| 1.2.2 Problemas específicos..... | 4 |
| 1.3 Objetivos de la investigación..... | 4 |
| 1.3.1 Objetivo general | 4 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 4 |
| 1.4 Justificación de la investigación..... | 4 |
| 1.5 Delimitación del estudio | 4 |
| Capítulo II. Marco teórico | 5 |
| 2.1 Antecedentes de la investigación | 5 |
| 2.1.1 Investigaciones internacionales | 5 |
| 2.1.2 Investigaciones nacionales..... | 7 |
| 2.2 Bases teóricas | 10 |
| 2.2.1 Enzimas microbianas | 10 |
| 2.2.2 Proteasas | 12 |
| 2.2.3 Clasificación de las Proteasas..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4 Género <i>Bacillus</i> como Fuente de Enzimas con Aplicaciones Industriales | 14 |
| 2.2.5 Género <i>Bacillus sp.</i> | 14 |
| 2.2.5.1 Generalidades..... | 14 |
| 2.2.5.2 Ecología | 14 |
| 2.2.5.3 Taxonomía | 15 |
| 2.3. Definición de términos básicos | 15 |
| 2.4 Hipótesis de investigación..... | 16 |
| 2.4.1 Hipótesis general | 16 |
| 2.4.2 Hipótesis específicas..... | 16 |
| 2.4.3 Operacionalización de las variables | 16 |
| Capítulo III. Metodología | 17 |
| 3.1 Diseño metodológico..... | 17 |
| 3.1.1 Tipo de investigación..... | 17 |
| 3.1.2 Nivel de Investigación | 17 |
| 3.2 Población y muestra | 17 |
| 3.2.1 Población | 17 |
| 3.2.2 Muestra..... | 17 |
| 3.3 Técnicas de recolección de datos | 17 |
| 3.3.1 Recolección y transporte de la muestra | 17 |
| 3.3.2 Aislamiento de <i>Bacillus sp.</i> | 17 |
| 3.3.3 Selección de cepas de <i>Bacillus sp.</i> con mayor actividad proteolítica..... | 18 |
| 3.3.4 Producción de proteasas a nivel laboratorio | 18 |
| 3.3.5 Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas | 18 |
| 3.4 Técnicas para el procesamiento de la información | 18 |
| Capítulo IV. Resultados | 19 |
| 4.1 Análisis de resultados..... | 19 |
| 4.1.1 Recolección y transporte de la muestra | 19 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2 Aislamiento de <i>Bacillus sp</i> | 19 |
| 4.1.3 Selección de cepas de <i>Bacillus sp.</i> con mayor actividad proteolítica..... | 20 |
| 4.1.4 Producción de proteasas a nivel laboratorio | 22 |
| 4.1.5 Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas | 22 |
| Capítulo V. Discusión..... | 23 |
| 5.1 Discusión de resultados | 23 |
| Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones | 24 |
| 5.1 Conclusiones | 24 |
| 5.2 Recomendaciones | 24 |
| Capítulo VII. Referencias | 25 |
| 7.1 Fuentes bibliográficas..... | 25 |
| Anexos | 30 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. <i>Clasificación de enzimas según la Enzyme Commission</i> ; Error! Marcador no definido. | |
| Tabla 2. <i>Ejemplos de Cada Tipo de Proteasa y su Fuente de Obtención</i> | 13 |
| Tabla 3. <i>Variables, definición, dimensiones e indicadores</i> | 16 |
| Tabla 4. <i>Resultados de la coloración Gram de las colonias aisladas</i> | 20 |
| Tabla 5. <i>Análisis de varianza (ANOVA) con una significancia del 0.05%</i> | 21 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1.</i> Esquema general de la reacción catalítica de una enzima | 11 |
| <i>Figura 2.</i> Barra de los resultados del tamaño de los halos | 21 |
| <i>Figura 3.</i> Halo del crecimiento bacteriano en medio (A) y medición del halo con (B) | 21 |
| <i>Figura 4.</i> Muestras seleccionadas y su control en un medio específico para la producción de proteasas | 22 |
| <i>Figura 5.</i> Resultado de la cuantificación en el espectrofotómetro..... | 22 |

Resumen

El descubrimiento de bacterias productoras de proteasas sirvió de base para una serie de estudios e investigaciones sobre fabricantes de enzimas, ya sea bacterias u hongos, en el país y proporcionó un contexto conveniente para el crecimiento de industrias e instituciones comprometidas a la extracción de estos productos biológicos.

Objetivo: Optimizar la actividad proteolítica de cepas de *Bacillus sp.*, extraídos de tierras de cultivo en Huacho – Perú.

Metodología: Se procedió a recolectar muestras de suelos de cultivos de forma aleatoria, las muestras tuvieron aproximadamente 200g de tierra, Desde una distancia inicial de 5 cm de la superficie del suelo, se realizó una excavación adicional de 10 cm para obtener la segunda muestra. Se extrajo 1 gramo de suelo de la muestra recopilada, seguido de diluciones seriadas en solución salina estéril hasta alcanzar una dilución de 10^{-4} . Posteriormente, se llevó a cabo un shock térmico a 60°C durante 30 minutos para obtener esporas puras, las cuales se sembraron en la superficie de Agar Nutritivo en volúmenes de 0,1 ml. Las placas se llevaron a incubación a una temperatura de 37°C por un tiempo de 48 horas. Después de la incubación, se examinaron las colonias en el agar, seleccionando aquellas con características microscópicas sospechosas de *Bacillus sp.* y realizando una tinción Gram. Por último, la actividad proteolítica fue activada mediante un proceso de inducción en las cepas aisladas. Para ello, estas cepas se sembraron en Leche descremada ultra light 1% + Cloruro de Calcio 0.5 g/L en placas Petri mediante a la técnica por picadura y paso a incubación. Se realizó lecturas del halo cada 24 horas. La producción de proteasas a nivel laboratorio en la cual se utilizaron dos matraces de vidrio de 1L. Luego se le agregaron 70 mL del inóculo (6×10^8 UFC/mL) y se puso en funcionamiento y se incubaron. Se extrajeron 8 mL de la muestra del matraz cada 24 horas, después de la recolección, se llevó a cabo un centrifugado a 3000 rpm en un tiempo de 15 minutos En el sobrenadante resultante, se procedió a cuantificar en relación con el periodo de incubación las unidades de proteasas fabricadas. La medición de la actividad enzimática de las proteasas se realizó añadiendo 2 mL de solución de caseína al 1.5% (pH 8) junto con 2 mL de sobrenadante a un tubo de ensayo. La mezcla se pasó a incubar a 37°C en un tiempo de 60 minutos. Posteriormente, se detuvo la reacción agregando 2,5 mL de Ácido Clorhídrico (0,1 N), seguido de una centrifugación a 3000 rpm durante 15

minutos a la intemperie. Por consiguiente, se combinaron 2 mL de reactivo de Biuret con 2 mL de sobrenadante en tubos de ensayo. Tras una mezcla breve de 10 segundos, la solución fue llevada a cuartos oscuros durante 30 minutos y a una longitud de onda de 540 nm se midió la absorbancia. La cantidad de proteasas producidas fue analizada por medio de un examen estadístico de Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 0.05% para determinar la presencia de diferencias significativas.

Resultados: Se aislaron 11 bacterias de las zonas muestreadas con características morfológicas de *Bacillus*. Las características de las colonias obtenidas presentaron forma circular, color crema y de consistencia gomosa en la mayoría de los casos, y la mayoría se presentan como bacilos Gram positivos creadoras de endospora. Las cepas que tuvieron mejor tamaño de halo luego de las 24h de incubación en el medio empleado fueron las de MP11 con 1.16 cm y la MS17 con 1.1 cm, estas fueron seleccionadas para la siguiente prueba de cuantificación de proteínas. La producción de proteasas a nivel laboratorio en la cual se seleccionaron las dos mejores cepas (MP11 y MS17) para producir la proteasa a nivel laboratorio en el medio líquido ya descrito y su respectivo control. La medición de la actividad enzimática de proteasas. Las muestras de las proteasas fueron cuantificadas teniendo como resultados mejores valores que el control positivo.

Conclusiones: Se aislaron microorganismos del género *Bacillus* fabricadoras de proteasas, procedentes de campos de sembrío de la UNJFSC. Los aislado bacteriano Gram positivos codificados como MP11 y MS17, resalto por producir un diámetro de halo de hidrólisis de MS17 1.1milímetros y MP11 1.6 milímetros.

Palabras clave: *Bacillus*, proteasas, enzima y nivel laboratorio.

Abstract

The discovery of protease-producing bacteria served as the basis for a series of studies and research on enzyme-producing microorganisms in the country and provided a favorable context for the development of companies and institutions dedicated to the extraction of these biological products.

Objective: Optimize the proteolytic activity of *Bacillus* sp. strains, isolated from farmland in Huacho – Perú.

Methodology: Crop soil samples were collected randomly, the samples had approximately 200g of soil. From an initial distance of 5 cm from the soil surface, an additional excavation of 10 cm was carried out to obtain the second sample. 1 gram of soil was extracted from the collected sample, followed by serial dilutions in sterile saline until a 10^{-4} dilution was reached. Subsequently, a heat shock was carried out at 60°C for 30 minutes to obtain pure spores, which were sown on the surface of Nutrient Agar in volumes of 0.1 ml. The plates were incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, the colonies on the agar were examined, selecting those with microscopic characteristics suspicious of *Bacillus* sp. and performing a Gram stain. Finally, the isolated strains were exposed to an induction process to activate their proteolytic activity. For this, the strains were seeded by puncture in Petri dishes with Nutrient Agar + Ultra Light Skim Milk 1% + Calcium Chloride 0.05 g/L + Glucose 0.5 g/L and incubated. Halo readings were taken every 24 hours. The production of proteases at the laboratory level in which two 1L glass flasks were used. Then 70 mL of the inoculum (6×10^8 CFU/mL) was added and it was put into operation and incubated. 8 mL of the sample was removed from the flask every 24 hours, after collection, centrifugation was carried out at 3000 rpm for 15 minutes. In the resulting supernatant, the protease units produced were quantified in relation to the incubation time. Measurement of the enzymatic activity of proteases was performed by adding 2 mL of supernatant to a test tube together with 2 mL of 1.5% casein solution (pH 8). The mixture was incubated at 37°C for 60 minutes. Subsequently, the reaction was stopped by adding 2.5 mL of Hydrochloric Acid (0.1 N), followed by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes at room temperature.

In separate test tubes, 2 mL of supernatant was combined with 2 mL of Biuret reagent. After a brief mixing of 10 seconds, the solution was allowed to stand in the dark for 30 minutes

and the absorbance was measured at a wavelength of 540 nm. The amount of proteases produced was analyzed using the Analysis of Variance (ANOVA) statistical test with a significance level of 0.05% to determine the presence of significant differences.

Results: 11 bacteria were isolated from the sampled areas with morphological characteristics of *Bacillus*. The characteristics of the colonies obtained were circular in shape, cream colored and rubbery in consistency in most cases, and the majority presented as Gram positive bacilli creating endospores. The strains that had the best halo size after 24 h of incubation in the medium used were MP11 with 1.16 cm and MS17 with 1.1 cm; these were selected for the following protein quantification test. The production of proteases at the laboratory level in which the two best strains (MP11 and MS17) were selected to produce the protease at the laboratory level in the liquid medium already described and its respective control. Measurement of protease enzymatic activity. The protease samples were quantified, resulting in better values than the positive control.

Conclusions: Protease-producing microorganisms of the *Bacillus* genus were isolated from UNJFSC cultivation fields. The Gram positive bacterial isolates coded as MP11 and MS17 stood out for producing a hydrolysis halo diameter of MS17 1.1 millimeters and MP11 1.6 millimeters.

Keywords: *Bacillus*, proteases, enzyme and laboratory level.

Introducción

El descubrimiento de bacterias productoras de proteasas sentó las bases para una serie de estudios sobre microorganismos que producen enzimas en el país y sentó un precedente favorable para el crecimiento de organizaciones que se dedican a la adquisición de estos productos biológicos, además de explotar el potencial de los microorganismos, no solo como patógenos, sino también como productores comerciales de enzimas (Salazar, 2022).

Las proteasas, pertenecientes a la clase tipo III de las hidrolasas son las que descomponen proteínas. Según del sustrato que descomponen reciben diferentes denominaciones las cuales son; queratinasas, gelatinasas, caseinasas, etc. Una prueba clásica para determinar si las bacterias producen proteasas es la prueba de caseína con agar de leche desnatada (una proteasa que descompone la caseína, una proteína que se encuentra en la leche). Se ha informado en la bibliografía que las proteasas son enzimas eficaces para mejorar las propiedades sensoriales del queso, ya que no solo tienen el potencial de mejorar productos comerciales procedentes de la leche, así como los son; el yogur o las bebidas energéticas, sino que son de gran relevancia como agregados en la industria de detergentes (Haddar et al., 2009).

El empleo de enzimas del sector industrial y el valioso y progresivo mundo de enzimas, que se está realizando a expensas de recientes procedimientos industriales, requiere su uso para mejorar la eficiencia y, por tanto, la rentabilidad y el cuidado del medio ambiente, ya que los microorganismos productores de enzimas son fáciles de cultivar. Existen modernas técnicas de ingeniería genética para perfeccionar sus parámetros de producción y adaptarlos a los diferentes entornos existentes, el medio ambiente proporciona un campo interesante para el progreso académico y tecnológico en la industria de los microorganismos producen estas enzimas (Singh et al., 2016).

Diversos estudios han encontrado que las especies pertenecientes al género *Bacillus sp.* originan enzimas hidrolíticas de importancia económica como son las proteasas, quitinasas y amilasas, que permiten su uso en diversas industrias. Esta proteasa se origina a nivel industrial y se utiliza en la formulación de agentes de aseo y en la preparación de hidrolizados de proteínas partiendo de diversas fuentes de proteínas (Nadeem et al., 2007).

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción de la realidad problemática

Las proteasas poseen un gran potencial en la biotecnología y, en consecuencia, experimentan una elevada demanda, constituyendo aproximadamente el 65% de todas las enzimas en el comercio internacional (Hadjidj et al., 2018). Estas enzimas se utilizan en una variedad de aplicaciones, incluyendo fábricas de medicamentos y productos de belleza, la fabricación de detergentes, la fabricación de alimentos, la producción de cuero y los procesos de biorremediación, entre otros. (Tavano et al., 2018). En la industria alimentaria se utilizan para ablandar la carne porque descomponen el colágeno y la elastina. Además, se aprovechan para hacer pan descomponiendo el gluten y aumentando de esa manera la capacidad de la masa para prevenir burbujas de aire (Contesini et al., 2017). En producción del cuero, las proteasas desempeñan un papel crucial al facilitar el proceso de ablandamiento del cuero. Asimismo, las proteasas en la industria de los detergentes tienen la capacidad de descomponer las proteínas que se adhieren a los filamentos textiles, entre otras utilidades relevantes. (López-Otin & Bond., 2008).

Últimamente, la atención de la investigación se ha concentrado principalmente en el análisis de las proteasas microbianas, dado que presentan diversos beneficios en confrontación con las proteasas de origen animal o vegetal (Sawant & Nagendran, 2014). Los beneficios esenciales son menores costos de elaboración, una elevada posibilidad de producción en grandes cantidades, manipulación genética más fácil y tiempos de producción más cortos, ya que los microorganismos tienen un periodo de tiempo de crecimiento relativamente corto en comparación con las plantas o los animales (López-Otín y Bond, 2008). Las proteasas, según lo mencionado anteriormente, hacen que sean biocatalizadores idóneos para diversas aplicaciones industriales.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Se puede optimizar la actividad proteolítica de cepas de *Bacillus sp.*, aislados de tierras de cultivo en Huacho - Perú?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Se puede aislar a partir de suelos de cultivo cepas de *Bacillus sp.*?
- ¿Se conseguirá seleccionar cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad de proteasas?
- ¿Se logrará cuantificar en un biorreactor la actividad enzimática de cepas *Bacillus sp.*?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

1.1.1 Optimizar la actividad proteolítica de cepas de Bacillus sp., aislados de tierras de cultivo en Huacho - Perú Problemas específicos

- ¿Se puede aislar a partir de suelos de cultivo cepas de *Bacillus sp.*?
- ¿Se conseguirá seleccionar cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad de proteasas?
- ¿Se logrará cuantificar en un biorreactor la actividad enzimática de cepas *Bacillus sp.*?

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Optimizar la actividad proteolítica de cepas de *Bacillus sp.*, aislados de tierras de cultivo en Huacho - Perú

1.2.2 Objetivos específicos

- Aislar a partir de suelos de cultivo cepas de *Bacillus sp.*
- Seleccionar cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad de proteasas.
- Cuantificar en un biorreactor la actividad enzimática de cepas *Bacillus sp.*

1.4 Justificación de la investigación

En años recientes, las investigaciones sobre *Bacillus sp.* se enfocan en enzimas. Las enzimas de este tipo de bacteria ya que presentan propiedades especiales que ofrecen un elevado potencial biotecnológico. En particular, las proteasas se utilizan ampliamente en la industria de detergentes, alimentaria, textil, etc. La caracterización bioquímica de las proteasas producidas por tales microorganismos es muy importante, porque además de una alta actividad

enzimática, también poseen propiedades de proteasa que no poseen otros tipos de bacterias, por lo que pueden producirse a gran escala y luego usarse en la industria y con fines comerciales dependiendo de sus propiedades bioquímicas (Montes, 2020). Gran parte de las proteasas mercantiles se derivan de bacterias (Castillo & Rodríguez, 2015). Casi todas las proteasas mercantiles operan en un intervalo de temperatura de 40 a 80 °C y su potencial de hidrogeno de 10 a 12 y son resistentes a detergentes o tensioactivos (Parihar & Dubey, 2017). Con base a las propiedades obtenidas, será necesario en el futuro purificar estas enzimas y realizar aplicaciones industriales óptimas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar a partir de suelos de cultivo cepas de *Bacillus sp.*
- Seleccionar cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad de proteasas.
- Cuantificar en un biorreactor la actividad enzimática de cepas *Bacillus sp.*

1.4 Justificación de la investigación

En años recientes, las investigaciones sobre *Bacillus sp.* se enfocan en enzimas. Las enzimas de este tipo de bacteria ya que presentan propiedades especiales que ofrecen un elevado potencial biotecnológico. En particular, las proteasas se utilizan ampliamente en la industria de detergentes, alimentaria, textil, etc. La caracterización bioquímica de las proteasas producidas por tales microorganismos es muy importante, porque además de una alta actividad enzimática, también poseen propiedades de proteasa que no poseen otros tipos de bacterias, por lo que pueden producirse a gran escala y luego usarse en la industria y con fines comerciales dependiendo de sus propiedades bioquímicas (Montes, 2020). Gran parte de las proteasas mercantiles se derivan de bacterias (Castillo & Rodríguez, 2015). Casi todas las proteasas mercantiles operan en un intervalo de temperatura de 40 a 80 °C y su potencial de hidrogeno de 10 a 12 y son resistentes a detergentes o tensioactivos (Parihar & Dubey, 2017). Con base a las propiedades obtenidas, será necesario en el futuro purificar estas enzimas y realizar aplicaciones industriales óptimas.

1.5 Delimitación del estudio

El proyecto de estudio actual fue llevado a cabo en el laboratorio multifuncional de la Escuela profesional de Biología con mención en Biotecnología de la U.N.J.F.S.C., por su gran infraestructura y equipamiento para el avance de este proyecto. De este modo se empleó al máximo los reactivos y equipos necesarios y, esto permitió enfocar la tesis en un sentido claramente delimitado de investigación dentro de la universidad, que fue desarrollado a lo largo de estos meses.

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Investigaciones internacionales

Cuevas (2021), cuyo proyecto se basa en una revisión de los avances recientes en la familia de las xilanasas y sus modos de acción, centrándose en los microorganismos termófilos, la expresión heteróloga y su valor en diversas utilidades industriales. Nos introdujo a las células vegetales y al uso de enzimas específicas del sustrato (xilano) y con mejor actividad catalítica. Estas enzimas tienen aplicaciones industriales, pero para funcionar eficazmente en estas industrias, las xilanasas deben poder soportar temperaturas y valores de pH extremos, y encontrar xilanasas a partir de microorganismos termófilos es muy importante en la investigación. La importancia de las enzimas termoestables está relacionada, entre otras cosas, con su capacidad para aumentar la solubilidad de sustratos y productos y reducir el tiempo de hidrólisis, lo que las hace más atractivas y beneficiosas en comparación con las enzimas de microorganismos mesófilos. Entre los microorganismos de los que se obtienen las xilanasas se encuentran los microorganismos termófilos con capacidad de desarrollarse a temperaturas entre 50 y 80 °C o superiores en el caso de los extremófilos y calificadas para fabricar xilanasas termoestables, como bacterias, hongos y arqueas. A causa de la complejidad de cultivar microorganismos termófilos (o extremófilos) y obligación de elevar la producción y el equilibrio de la xilanasas para fines industriales, se necesitan mejoras en la biotecnología utilizando métodos como el ADN recombinante y la tecnología de proteínas.

Laureano (2020), en este trabajo se utilizaron preparaciones enzimáticas de especímenes antárticos como *Flavobacterium sp.*, la cual se analizó la cepa AU13 y su potencial biotecnológico. El análisis de espectrometría de masas determinó que la enzima principal en

la preparación enzimática era una proteína de 48 kDa. El fragmento propuesto tiene una alta similitud de secuencia con la epralisina de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. La epralisina es una proteína extracelular alcalina, también una metalopeptidasa pertenecientes a la subfamilia de la serralisina. El efecto de distintos inhibidores confirmó que la enzima era una metalopeptidasa. La acción proteolítica fue alta en el intervalo de pH (5 a 8) a 40 °C de temperatura, dando a conocer que esta peptidasa extracelular es una enzima psicrófila. Investigaciones registradas han demostrado que la actividad de las enzimas en las preparaciones enzimáticas es resistente a la acción de tensioactivos y oxidantes, lo que sugiere un uso posible como aditivos en composiciones detergentes. Las propiedades y el rendimiento de cuyas enzimas han aumentado el interés en explorar más a fondo su potencial como peptidasas biotecnológicas.

Montes (2020), en este estudio se caracterizó la proteasa elaborada por un termotolerante *Bacillus licheniformis* LB04 obtenido en la ciudad de Mina, Nuevo León; por su función y equilibrio de diversos factores. Se calculo la actividad proteolítica y la actividad enzimática total fue 117.1 U/ml, la actividad específica fue 98,6 U/mg, la temperatura máxima de actividad enzimática fue 40 °C y el pH máximo de actividad enzimática fue 8,0. En la prueba de equilibrio enzimático a distintas temperaturas y pH, la actividad enzimática se mantuvo al 50% a pH 8 y en un intervalo de temperatura de 40 hasta 70°C. La actividad enzimática permanece entre 70-50% a 40°C y pH 8-10. La actividad del extracto enzimático crudo se mantiene en 91 %, 61 % y 13 % a concentraciones de SDS inferiores a 0,5 %, 1 % y 5 %; Tomando a Tritón como ejemplo. A partir de los datos recopilados al medir la actividad enzimática en diversos niveles de pH, se evidencia que las proteasas involucradas son de naturaleza alcalina. El extracto enzimático crudo tiene un elevado equilibrio frente a los tensioactivos.

Najera (2018), en este trabajo investigaron si algunas proteasas secretadas por *Escherichia coli* están genéticamente asociadas con el fenotipo de resistencia a β -lactámicos. Con ese propósito, se seleccionaron 40 aislados bacterianos de procedencia animal y 37 cepas bacterianas de procedencia médica. Entre los aislados finales, se notó un mayor del 65% exhiben la capacidad de producir proteínas que pueden degradar las inmunoglobulinas humanas, así como el principal transportador de HSA en plasma. El rango de masa molecular de las proteasas observado en estas bacterias varía de 25 a 200 kDa. Cepa *Escherichia coli* SN137, aislada del hemocultivo de una persona tratante, manifiesta una proteasa de elevado peso molecular (160 kDa) que descompone IgG, IgA y la HSA. La actividad enzimática

estuvo activa en un intervalo de pH de 5,6 a 9,5 y una temperatura de 28 a 55 °C, lo que muestra una amplia estabilidad de la enzima. Las bacterias en el medio líquido mostraron una actividad proteolítica evidente después de 24 h, y esta actividad duró hasta las 36 h y luego se debilitó gradualmente. La función de degradación de proteínas de SN137 no fue afectada por la existencia de compuestos que reprimen proteasa o la incorporación de proteasas externas y suele depender del ácido nucleico. No se pudo determinar la identidad de estas proteínas, pero no hubo una relación con las proteínas generadas a partir de la información contenida en los genes. TSH, PET y PIC ni con las proteasas expuestas por diferentes patotipos de *E. coli*. *Escherichia coli*, sus fragmentos circulares de ADN conocidos como plásmidos de esta no consiguen la codificación de enzimas proteolíticas, por lo que la modificación de *E. coli DH5* con ellas no induce la degradación de proteínas ya que los estudios del patotipo SN137 mediante Southern blot demostraron que esta bacteria no presenta alguna patogenicidad en humanos. Naturaleza de la enfermedad. Al secuenciar el genoma de *E. coli 137* y ensamblar sus lecturas, pudimos realizar comparaciones de tipos MLST y concluir que El microorganismo en cuestión pertenece al tipo APEC, y se ha identificado que su genoma posee genes responsables de la codificación de proteasas e inhibidores de ellas.

Guevara y Guido (2017), se centraron en analizar las actividades enzimáticas de cepas de *Bacillus sp.* (XSCD-9, xsc-9, X2-10) ya investigadas, con este fin, estas cepas se procesaron utilizando métodos de laboratorio, las unidades hidrolíticas de halo y anson se sometieron a análisis probióticos y se determinaron medios industriales rentables para la propagación y producción óptimas de enzimas proteolíticas microbianas candidatas. Esta cepa fue la cepa con mayor producción de enzima proteolítica (17,5336 AU y un halo de hidrólisis de 30 mm a 39 °C (evaluada por el método del coeficiente estadístico de variación) y tuvo el porcentaje más bajo entre las 3 cepas analizadas.

2.1.2 Investigaciones nacionales

Salazar (2022), su objetivo del estudio fue identificar especies de bacterias pertenecientes a la familia Bacillaceae con la competencia de elaborar proteasas y que se encuentran en las piscinas del Atractivo Turístico Baños del Inca. Se tomaron muestras acuáticas procedentes de 10 pozas. en dicho complejo y se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cajamarca para su ensayo, investigación y evaluación. Se agito las muestras manualmente, luego se inoculo en caldo leche 100 mL de cada muestra y se pasó a un

proceso de incubación a 55 °C por un tiempo de 7 días. Tras completar el proceso de enriquecimiento, se sembraron alícuotas en placas de agar leche, las cuales fueron incubadas durante 48 horas a una temperatura de 55°C. Los aislamientos resultantes fueron sometidos a caracterización mediante tinciones y ensayos bioquímicos estándar, además de evaluarse su capacidad para la producción de proteasas mediante la formación de halos hidrolíticos en agar leche desnatada a distintas temperaturas a las que se lleva a cabo el proceso de incubación. durante 48 h. De todos los cultivos se extrajo ADN genómico con ensayos de hidrólisis positiva y se amplificó el gen 16S ARNr por medio de la tecnología de PCR; los productos de PCR se evaluaron a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa y se enviaron para secuenciación. Se obtuvieron 14 aislados de *Brevibacillus borstelensis* productores de proteasas que produjeron un halo de hidrólisis de 60 milímetros a 55 grados de temperatura. *Aneurinibacillus thermoaerophilus* y *Anoxybacillus rupiensis*, formaron cada uno un halo de 40 mm a 55°C. Por último, especies de la familia Bacillaceae productoras de proteasa aisladas del agua mineral termal del Atractivo Turístico Baños del Inca son: *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus licheniformis* y *A. rupiensis*.

Gamarra (2020), su investigación se centró en evaluar los niveles de acidez o alcalinidad, y la medida de la energía térmica (temperatura), para medir la actividad de las proteasas con pH básico. Las cepas de *Bacillus sp.* que producen proteasas alcalinas se aíslan de las tierras de cultivo de maíz en las ciudades de Reque-Lambayeque, Huanchaco-La Libertad y Huanchaquito-La Libertad. Se determinaron los factores de temperatura y pH ideales, y después se identificaron molecularmente las cepas de *Bacillus sp.* con la mejor actividad proteolítica. Debido a la degradación de proteínas, se evaluó por espectrofotometría a 340 nm la liberación del componente azo de la azocaseína. De las 35 cepas de *Bacillus* que se aislaron, cuatro mostraron una actividad proteolítica mayor (F, 7, 26 y 29). A pH de 10,5 y a una temperatura de 37 °C, las cepas con la codificación 7 y 29 de *Bacillus pumilus* mostraron una elevada actividad proteolítica; la cepa 7 mostró una absorbancia de 0,373 y la cepa 29 mostro una absorbancia de 0,349. *Bacillus safensis* (cepa 26) demostró la mejor actividad proteolítica a pH 11 a una temperatura de 37°C y una absorbancia de 0,399. *Bacillus cereus*, (cepa F), mostró una actividad proteolítica de 0.314 de absorbancia a pH 7,5 y una temperatura de 28 °C. Se ha llegado a la conclusión de que las cepas ambientales de *Bacillus* alcalófilos que desempeñan sus mejores actividades enzimáticas se encuentran entre niveles de pH de 7,5 a 11 y temperaturas entre los 28 °C a 50 °C.

Solorzano (2018), en su investigación evaluó la actividad enzimática para medir la fabricación de proteasas y amilasas, de 34 cultivos de *Bacillus* aislados del suelo de la Universidad Nacional de Trujillo. Para lograrlo, se reactivó y se verificó que los cultivos conservados en glicerol al 10% eran puros. Por consiguiente, se escogieron las bacterias que producen proteasas en agar leche y amilasa en agar almidón. Los inóculos de los cultivos elegidos fueron cultivados en caldo almidón para producir amilasa y para producir proteasas en caldo caseína. Pasado las 48 horas, los preparados enzimáticos (PE) se centrifugaron, para su extracción por 10 minutos a 4 °C y 5000 rpm. Aplicando el método de Street Close modificado, se midió la actividad enzimática de las amilasas, mientras que las proteasas se determinaron por medio de la descomposición de la caseína. De los 34 cultivos, 11 elaboraron amilasas, mientras que 9 produjeron proteasas. Llegaron a la conclusión que las amilasas elaboradas por 11 cepas de *Bacillus* seleccionadas tenían una actividad enzimática entre 0,4 a $2,7 \times 10^{-2}$ Unidades Street Close/100 mL de preparado enzimático, mientras que las proteasas elaboradas por 09 cepas de *Bacillus* seleccionadas tenían una actividad enzimática entre los 0,03 a 0,06 Unidades de proteína/mL de preparado enzimático.

Carranza (2017), el objetivo consistió en seleccionar y aislar cultivos nativos de *Bacillus sp.* capaces de producir proteasas usando el compostaje de la estación experimental de la Universidad Nacional de Trujillo. En este proceso, como muestra enriquecida se recogió compostaje con una solución de caseína al 1%, la cual fue sometida a un tratamiento térmico durante 15 minutos a 80 °C. Se realizaron diluciones seriadas de *Bacillus* nativos para aislarlo, de las últimas dos muestras, se sembró 0.1 mL en placas de agar caseína por técnica de estriado, las cuales fueron incubadas a 37°C durante aproximadamente 24 a 48 horas. Se seleccionaron cultivos bacterianos y se trasladaron a biorreactores de sistema agitado que contenían caldo caseína como pre-enriquecimiento y se dejó a intemperie. Cada 24 horas, de cada biorreactor se extrajeron 8 mL de muestra, la cual fue centrifugada para determinar la producción de proteasas y así midieron la caseína residual, calculando con relación al tiempo de incubación la cantidad de proteasas producidas, siguiendo la metodología de Sharmin y Rahman para determinar la actividad enzimática de las proteasas. Este método proporciona una medida cuantitativa precisa de la actividad enzimática, permitiendo evaluar la eficiencia de la producción de proteasas a lo largo del periodo de incubación. Dos cultivos bacterianos, el FGM-02DL y el FGM-17DL, se seleccionaron de los 23 cultivos bacterianos aislados debido a que presentaron un grosor de halo de hidrólisis de 3,3 cm y 3,7 cm respectivamente. Las colonias de dichos cultivos exhibieron un volumen que oscilaba entre 3 y 4 mm, con una

forma circular y elevación convexa, los bordes eran desiguales, y su apariencia era seca, similar a la de un vidrio esmerilado. Adicionalmente, mostraron un color beige o beige claro, y los bacilos grampositivos presentaron esporas esféricas ubicadas en la posición central y no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las unidades enzimáticas promedio (UE/mL) de los cultivos FGM-02DL y FGM-17DL. Esta observación sugiere tanto uno y otro cultivo bacteriano comparte la misma habilidad hidrolítica sobre la caseína. En otras palabras, ambas cepas son capaces de descomponer o hidrolizar la caseína de manera similar, lo que indica una actividad enzimática consistente en este aspecto particular del sustrato.

Garete (2016), el objetivo del estudio fue examinar bacterias aisladas con capacidad de producir enzimas proteolíticas extraídas de las salineras de Maras en el departamento de Cusco. Se emplearon dos cepas halotolerantes (N9 y N10), las cuales fueron sometidas a evaluación en términos de su capacidad para hidrolizar diversos sustratos. De acuerdo con los resultados, se desarrolló un formato para la obtención de proteasas mediante el proceso de excreción, donde se estudian diferentes características ambientales presentes del medio de cultivo con el fin de aumentar la generación de enzimas por parte de las bacterias investigadas. Se buscaron proteasas en los extractos obtenidos después del cultivo bacteriano. Las cepas bacterianas N9 y N10 excretaron proteasas con una actividad enzimática de 49,09 U/mL/min y 140,45 U/mL/min, respectivamente. El análisis de comprobación demostró que la cepa N9 tiene 3 proteasas con tamaños moleculares de alrededor de 38,8 kDa, 47,2 kDa, y 60,5 kDa, mientras que la cepa N10 tiene 2 proteasas con tamaños moleculares de alrededor de 47,2 kDa y 60,5 kDa. De acuerdo con estudios de sustratos copolimerizados que son capaces de inducir la reducción o bloqueo de la actividad, se determinó que la cepa N9 tiene la capacidad de generar enzimas proteolíticas de metalo, aspártico y serín, las cuales son inhibidas por EDTA, Pepstatín A y PMSF, respectivamente. Por otro lado la cepa N10, su extracto de excreción, está principalmente compuesto por metaloproteasas. Además, se identificó una enzima en la cepa N10, reprimida por Leupeptín, Pepstatín A y PMSF y se sugiere y se refiere a proteasa aspártico-serín-cisteín.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Enzimas microbianas

Las enzimas microbianas juegan un papel importante en el desarrollo industrial. Su empleo reciente se enfoca en varios sectores. Hoy en día, se necesitan nuevas enzimas que haya

sido mejoradas, optimizadas y versátiles para desarrollar procesos de producción innovador, sustentable y de bajo costo (Adrio, 2014).

Las enzimas son moléculas que se componen de proteínas, que cualquier forma de vida genera para catalizar cambios químicos particulares (Figura 1) (Gurung et al., 2013). Estas moléculas están formadas principalmente por una extensa cadena de polipéptido, que están unificados por enlaces amida, y la numeración de estos aminoácidos se realiza según el nivel que toma en la cadena.

Los microorganismos se han utilizados comercialmente hace mucho tiempo, para la elaboración de licores, vinagre, pan y otros productos (Adrio, 2014). No obstante, este pensamiento proviene de cuestiones puramente prácticas, por ello con el paso de los siglos y los descubrimientos científicos recientes sobre el potencial metabólico de los microorganismos y las reacciones catalíticas mediadas por enzimas, las enzimas microbianas han ganado importancia económica (Singh et al. 2016).

Por estos motivos, distintas empresas industriales optan por el uso de microorganismos para renovar sus procesos utilizando las enzimas que los microorganismos producen, debido a la viabilidad de cultivo y manipulación genética de los microorganismos han podido mejorar sus procesos, por estas razones los microorganismos se utilizan en una extensa variedad de industrias, desde la producción de alimentos y bebidas hasta la farmacéutica, textil, papelera, del cuero y otras industrias que requieren microorganismos, enfoques más sostenibles, eficientes y económicos con el medio ambiente (Singh et al. 2016).

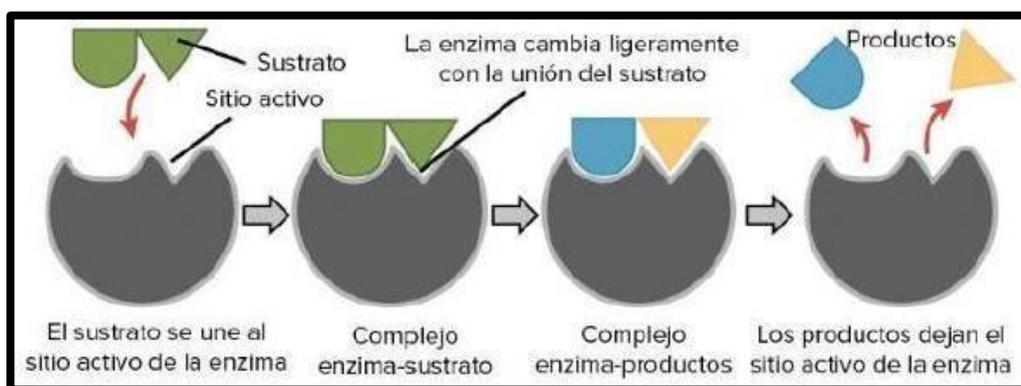


Figura 1. Esquema básico de la reacción catalítica llevada a cabo por una enzima.

Fuente: Khan academy, (2023).

En base a los estándares de la Enzyme Commission, las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos (Tabla 1).

| Nº | Clases | Reacción | Enzima |
|----|------------------------|---|---|
| 1 | Oxidoreductasas | Transferencia de hidrógeno u oxígeno o electrones entre moléculas. | Deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, peroxidasas. |
| 2 | Transferasas | Transferencia de grupos de átomos de una molécula a otra. | Fructosiltransferasas, transcetolasas, aciltransferasas, transaminasas. |
| 3 | Hidrolasas | Escisión hidrolítica de enlaces. | Proteasas, amilasas, acilasas, lipasas, fosfatasas, cutinasas. |
| 4 | Liasas | Escisión no hidrolítica por eliminación de reacciones de adición. | Pectatoliasas, hidratasas, deshidratasas, descarboxilasas, fumarasa, arginosuccinasa. |
| 5 | Isomerasas | Transferencia de grupo de una posición a otra dentro de una molécula. | Isomerasas, epimerasas, racemasas. |
| 6 | Ligasas | Unión covalente de dos moléculas acoplada con la hidrólisis de un enlace rico en energía en ATP o trifosfatos similares | Sintetasas, ligasas. |

Fuente: Singh et al. (2016).

Los estándares establecidos por la Comisión de Enzimas (EC) rigen la nomenclatura de las enzimas, que asignan a cada enzima un número de cuatro dígitos que reconoce la molécula enzimática y la acción química específica que facilita. (Boyce & Tipton, 2005)

2.2.2 Proteasas

Las enzimas hidrolasas fragmentan uniones covalentes a través de reacciones hidrolítica. Dentro de esta categoría se encuentran enzimas capaces de descomponer ADN, ARN, proteínas y carbohidratos complejos formados por un gran número de azúcares simples. (Armstrong & Bennet, 1986); hallando entre estas a las fosfatasas, lipasas, amilasas proteasas y clorofilasas.

Las enzimas capaces de llevar la hidrolisis, los enlaces peptídicos que están en los aminoácidos en un péptido o proteína se conocen como proteasas (Jellouli et al. 2011). En la mayoría de las instancias, las proteasas estimulan a un nucleófilo que, por su parte, ataca el carbono del enlace peptídico. A medida que el nucleófilo se une, los electrones del doble enlace carbono-oxígeno se desplazan en dirección al oxígeno, formando un intermediario de gran potencia. Generalmente, la proteasa adopta una estructura para estabilizar este intermediario. Finalmente, el intercesor se desnaturaliza, soltando dos porciones peptídicas (Tavano et al., 2018). Las proteasas desempeñan un papel esencial en diversos procesos fisiológicos, entre ellos la digestión y la renovación de proteínas, el procesamiento de hormonas peptídicas, la división celular, la transducción de señales, las cascadas de

coagulación, la apoptosis y sus fases biológicas de organismos patógenos, incluyendo los retrovirus y su replicación (Sawant y Nagendran, 2014).

2.2.3 Clasificación de las Proteasas

Generalmente se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Las endopeptidasas son responsables de desdoblar los enlaces peptídicos ubicados en el medio de una cadena peptídica. Por el contrario, las exopeptidasas eliminan el péptido terminal (Murray et al., 2014). Se distribuyen en dos categorías: carboxipeptidasas o aminopeptidasas, que hidrolizan proteínas en el carbono terminal o el amino-terminal respectivamente. Las proteasas también se clasifican de acuerdo con la estructura de diseño de sus sitios activos:

- **Serina proteasa:** Lo conforma una serina en su sitio activo que actúa como enzima intermediaria y está unida covalentemente a un fragmento de proteína.
- **Cisteína proteasa:** En su centro activo, la cisteína se ha unido covalentemente a una de las porciones proteicas.
- **Proteasas del ácido aspártico:** lo conforman dos unidades de aspartato esenciales fuertemente unidos entre sí en el sitio activo.
- **Las metaloproteasas:** tienen un sitio activo que contiene un ion metálico.

Tabla 2.

Ejemplos de Cada Tipo de Proteasa y su Fuente de Obtención

| Exopeptidasa | | Endopeptidasa | |
|---------------------------|------------|--------------------|------------|
| Enzima | Fuente | Enzima | Fuente |
| Cistein-proteasas | | | |
| Papaína | Vegetal | Catepsina C | Animal |
| Metaloproteasas | | | |
| Termolisina | Microbiana | Carboxipeptidasa A | Animal |
| Proteasa Aspártica | | | |
| Pepsina | Animal | | |
| Serin-Proteasas | | | |
| Proteinasa K | Microbiana | Carboxipeptidasa Y | Microbiana |

Fuente: Montes (2020)

2.2.4 Género *Bacillus* como Fuente de Enzimas con Aplicaciones Industriales

Dentro de los tipos de bacterias, el *Bacillus* es uno de los más importantes, idóneos para resistir situaciones de desarrollo hostiles. Estas bacterias son delgadas y elongadas con bordes redondeados, son bacilos Gram +, son quimiorganotrofos y aeróbicos o anaeróbicos facultativos (Whitman, 2009), son quimiorganotróficos y móviles debido a la presencia de flagelos del peritelio. Son hábiles en fabricar esporas (centrales, terminales y subterminales en condiciones aeróbicas) y, por lo tanto, pueden sobrevivir durante largos períodos en condiciones adversas (Winn et al. 2008). Por ser saprofitas, gran parte de las especies de este género conviven en agua, plantas y suelo (Negroni, 2009). Su habilidad de residir diferentes entornos (con diferente pH y temperatura) está relacionada con su diversidad metabólica, así el género contiene microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos, al igual que microorganismos alcalófilos y acidófilos (Castillo-Rodríguez, 2005). Algunas especies están calificadas para hidrolizar el almidón, ADN y una amplia gama de fuentes de carbono, como metanol, quitina y celulosa, etc. Debido a su metabolismo excepcional, se han detallado aproximadamente 70 especies de este género (Negroni, 2009) que resalta una elevada capacidad biotecnológica.

2.2.5 Género *Bacillus* sp.

2.2.5.1 Generalidades

Las bacterias del género *Bacillus*. Tienen su apariencia en formas de cayado, que suelen ser rectas o curvas; pueden agrupados en pares, en cadenas o incluso como largos filamentos. Tienen solo una endospora por célula, que es resistente a condiciones adversas o muy extremas. Son Gram positivos y gram negativos, pero algunos en las primeras etapas de su ciclo biológico suelen ser gram negativos. Sus flagelos periticos son móviles, mientras que otros no presentan movimiento. Son aeróbicos o anaerobios facultativos, pero algunas de las especies se han descrito como anaerobios obligados. El oxígeno es el último aceptor de electrones y puede ser sustituido según la especie en función. Gran parte de las especies de este género suelen cultivarse en agar sangre y agar nutritivo. Los tamaños y la formación de sus colonias en desarrollo varían entre las especies. Presentan una gran diversidad en su conducta fisiológica, desde psicrófilos a termófilos y desde acidófilos hasta alcalófilos, pero otras especies son halófilas. La catalasa, cuya enzima pertenece a las oxidoreductasas, es producida por la mayoría de las especies. La gran mayoría de las especies como reacción química puede ser oxidasa positiva o negativo. Estas especies del género *Bacillus* se pueden

ser aisladas de suelos o ambientes directa o indirectamente contaminados con suelo, y también están presentes en muestras clínicas, agua y alimentos. Sus esporas les permiten contaminar áreas como lo son; salas de operaciones, productos farmacéuticos y alimentos gracias a su resistencia para condiciones extremas. A excepción de *Bacillus anthracis*, La mayoría de las variedades o tipos de especies dentro de este género no muestran capacidad para causar enfermedades y son poco comunes la presencia de enfermedades en humanos y otros animales (Whitman, 2009).

2.2.5.2 Ecología

El género *Bacillus* se localizan en múltiples entornos, tanto en la naturaleza o en procesos antrópicos (ya sea como sustancia o contaminantes). En muchos casos, los aislamientos de este género provienen de entornos contaminados por el suelo o de muestras de suelo, como muestras clínicas, en muestras de alimentos y procesos de tratamientos de agua (Whitman, 2009).

2.2.5.3 Taxonomía

Robert Koch y Ferdinand Cohn describieron primero *Bacillus anthracis* y *Bacillus subtilis*. Los científicos solo podían realizar clasificaciones y descripciones basadas en caracteres morfológicos debido a las limitaciones tecnológicas. (Maughan & Van Der Auwera, 2011). Con el transcurso del tiempo, se han implementado mejoras tecnológicas que han permitido comprender la organización, las funciones vitales, y análisis de la información genética y los procesos moleculares que tienen lugar en los microorganismos. Actualmente, la taxonomía se basa principalmente en la secuencia del ADN ribosomal de la subunidad 16S (16S rDNA) y la información recopilada por investigadores a nivel mundial se comparte en bases de datos como el Proyecto de Base de Datos Ribosomal (Ribosomal Database Project). Partiendo de esta información, se ha elaborado la genealogía de *Bacillus*, anticipando el hallazgo al menos 116 especies de bacterias del género *Bacillus* (Maughan & Van Der Auwera, 2011).

2.3. Definición de términos básicos

- **Bacterias:** Las bacterias son microorganismos sin núcleo, con un volumen de unos pocos micrómetros y una gran variedad de formas, como esferas, barras, filamentos curvados y helicoidales. Las bacterias son células procariotas, por lo que no tienen núcleos definidos y tampoco presentan orgánulos endomembranosos.

- **Biorreactor:** Es un sistema que permite la transformación biológica. Esta definición puede referirse a cualquier conversión realizada por enzimas, microorganismos, células animales o vegetales.
- **Enzimas:** Proteínas solubles producidas por células de individuos que facilitan y regulan reacciones químicas en los sistemas de los organismos.
- **Medio de cultivo:** Es un conjunto de elementos que crean las condiciones necesarias para que los microorganismos se desarrollen. Los macronutrientes micronutrientes o trazas. Factores de desarrollo.

2.4 Hipótesis de investigación

2.4.1 Hipótesis general

La optimización de la actividad proteolítica de *Bacillus sp.*, aislados de suelos de cultivo presentará la máxima actividad enzimática en condiciones de laboratorio.

2.4.2 Hipótesis específicas

- El aislamiento de cepas de *Bacillus sp.* tendrán relación con las muestras de suelos de cultivo.
- La selección de cepas de *Bacillus sp.* tendrá relación con la mayor actividad de proteasas.
- La cuantificación en un biorreactor tendrá relación con la actividad enzimática de cepas *Bacillus sp.*

2.4.3 Operacionalización de las variables

Tabla 3.

Variables, definición, dimensiones e indicadores

| Variables | Definición | Dimensiones | Indicadores |
|---|---|------------------------|---|
| Independiente Proteasas | Las proteasas son enzimas que fragmentan las proteínas en unidades más pequeñas, como péptidos o aminoácidos, mediante un proceso de descomposición. | - Producción de enzima | - Actividad enzimática - pH - Temperatura |
| Dependiente <i>Bacillus sp.</i> | Es un tipo de bacteria que pertenece al grupo Gram positivo, es positiva para la enzima catalasa, se desarrolla en presencia de oxígeno y típicamente se halla en el suelo. | - Género bacteriano | - Identificación - Cuantificación |

Capítulo III. Metodología

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

El proyecto actual es de tipo aplicada, debido a que se indaga la utilización de los conocimientos que se adquiridos. Se caracterizó cada variable para una evaluación y análisis.

3.1.2 Nivel de Investigación

El proyecto es de tipo descriptivo, se utiliza cuando el investigador pretende sólo describir el escenario o caso; bajo el análisis de la investigación, ya que se pudo determinar que si se producía la enzima.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La comunidad fue compuesta con las cepas del suelo de cultivo de la UNJFSC.

3.2.2 Muestra

Las muestras fueron tomadas de la parte superficial del cultivo.

3.3 Técnicas de recolección de datos

3.3.1 Recolección y transporte de la muestra

Se llevaron a cabo la recolección de muestras de suelo de cultivos de manera aleatoria, las muestras tuvieron aproximadamente 200g de tierra, de una distancia de 5 cm de la planta (superficial), Después, se excavaron 10 cm para obtener la segunda muestra. Este mismo procedimiento se repitió para todos los puntos de muestreo. Luego las muestras fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.

3.3.2 Aislamiento de *Bacillus sp.*

De la tierra recolectada, se tomó una muestra de suelo equivalente a 1 gramo y se realizaron soluciones menos concentradas en solución salina libre de microorganismo, hasta alcanzar una dilución de 10^{-4} . Seguido de ello, se aplicó un golpe de calor a 60°C durante 30 minutos para obtener esporas puras. Posteriormente, se sembraron 0,1 mL por técnica de estriado en Agar Nutritivo. Las placas pasaron a un proceso de incubación a 37°C en un tiempo de 48

horas. Después de ello, se examinaron las colonias en el agar, seleccionando aquellas que mostraron características microscópicas sospechosas de *Bacillus sp.* Se llevó a cabo una coloración Gram para confirmar la identificación de las colonias seleccionadas.

3.3.3 Selección de cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad proteolítica

Las cepas aisladas se sometieron a un estímulo de actividad proteolítica. Con este fin, las cepas fueron cultivadas con Leche descremada ultra light 1% + Glucosa 0.5 g/L + Cloruro de Calcio 0.05 g/L en placas Petri por técnica de picadura en medio de agar nutritivo y se colocaron en incubación a 37°C por 48 horas. Se realizó lecturas del diámetro del halo cada 24 horas. (Gamarra, 2020).

3.3.4 Producción de proteasas a nivel laboratorio

Se utilizaron dos matraces de vidrio de 1L. En los cuales se colocaron 630 mL de Caldo nutritivo + leche descremada ultra light 1% + Cloruro de Calcio 0.05 g/L + Glucosa 0.5 g/L, luego se le agregaron 70 mL del inóculo (6×10^8 UFC/mL) y se puso en funcionamiento y se incubaron a temperatura ambiente. Se extrajeron 8 mL de la muestra del matraz cada 24 horas, y después, la muestra fue sometida a centrifugación a una velocidad de 3000 revoluciones por minuto durante un periodo de 15 minutos. En el sobrenadante, se cuantificaron, con relación al tiempo de incubación, las unidades de las proteasas producidas.

3.3.5 Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas

La actividad enzimática se diagnosticó mediante el ensayo elaborado por Sharmin & Rahman (2007). En un tubo de ensayo, se añadieron 2 mL de una solución de caseína al 1.5% a un pH de 8 y también 2 mL de sobrenadante y. La mezcla resultante paso a incubación a 37°C en un periodo de 60 minutos. Posteriormente, para interrumpir el curso de la reacción, se añadieron 2.5 mL de Ácido Clorhídrico a 0.1 N, y paso a un proceso de centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a intemperie. En otros tubos de ensayo, se añadieron 2 mL de reactivo de Biuret y 2 mL de sobrenadante. Después de mezclar durante 10 segundos, la solución se dejó reposar en la oscuridad durante 30 minutos, y se calculó a una longitud de onda de 540 nm la absorbancia.

3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

La cantidad promedio de proteasas generadas en cada caso de cultivos de bacterias del género *Bacillus*. fue analizada utilizando la prueba estadística de Análisis de Varianza

(ANOVA), con un nivel de significancia del 0.05%, para determinar si existe o no una diferencia significativa.

Capítulo IV. Resultados

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Recolección y transporte de la muestra

Las muestras fueron recolectadas de suelos de cultivos de la U.N.J.F.S.C., ubicado en la ciudad de Huacho, provincia de Huaura, Departamento de Lima, con Coordenadas: 11°07'26"S y 77°36'32"O.

4.1.2 Aislamiento de *Bacillus sp.*

Se aislaron 11 bacterias de las zonas muestreadas con características morfológicas de *Bacillus* de las parcelas de la UNJFSC. Las características de las colonias obtenidas presentaron forma circular, color crema y de consistencia gomosa en la mayoría de los casos. Las cepas se manifiestan como bacilos Gram positivos productores de endosporas, con distintas ubicaciones dentro de la célula vegetativa (ver Tabla 4). La caracterización microbiológica se llevó a cabo en agar nutritivo, mientras que la visualización microscópica se realizó mediante la técnica de tinción de Gram y se llevó a cabo la observación al microscopio óptico.

Tabla 4.

Resultados de la coloración Gram de las colonias aisladas

| Código de Laboratorio | Muestra Superficie (MS) | Morfología | Muestra Profundidad (MP) | Morfología |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| Muestra 1 | MS1 | No hubo crecimiento | MP1 | No hubo crecimiento |
| Muestra 2 | MS2 | Bacilo Gram + | MP2 | No hubo crecimiento |
| Muestra 3 | MS3 | Bacilo Gram + | MP3 | No hubo crecimiento |
| Muestra 4 | MS4 | No hubo crecimiento | MP4 | No hubo crecimiento |
| Muestra 5 | MS5 | No hubo crecimiento | MP5 | Bacilo Gram + |
| Muestra 6 | MS6 | No hubo crecimiento | MP6 | No hubo crecimiento |
| Muestra 7 | MS7 | Bacilo Gram + | MP7 | No hubo crecimiento |
| Muestra 8 | MS8 | No hubo crecimiento | MP8 | Bacilo Gram + |
| Muestra 9 | MS9 | No hubo crecimiento | MP9 | Bacilo Gram + |
| Muestra 10 | MS10 | No hubo crecimiento | MP10 | No hubo crecimiento |
| Muestra 11 | MS11 | No hubo crecimiento | MP11 | Bacilo Gram + |
| Muestra 12 | MS12 | No hubo crecimiento | MP12 | Bacilo Gram + |
| Muestra 13 | MS13 | No hubo crecimiento | MP13 | No hubo crecimiento |
| Muestra 14 | MS14 | No hubo crecimiento | MP14 | No hubo crecimiento |
| Muestra 15 | MS15 | No hubo crecimiento | MP15 | No hubo crecimiento |
| Muestra 16 | MS16 | Bacilo Gram + | MP16 | No hubo crecimiento |
| Muestra 17 | MS17 | Bacilo Gram + | MP17 | No hubo crecimiento |
| Muestra 18 | MS18 | No hubo crecimiento | MP18 | Bacilo Gram + |

4.1.3 Selección de cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad proteolítica

Las cepas que mostraron mejor tamaño de halo luego de las 24h de incubación en el medio empleado fueron las de MP11 con 1.16 cm y la MS17 con 1.1 cm (Figura 2), estas fueron seleccionadas para la siguiente prueba de cuantificación de proteínas.

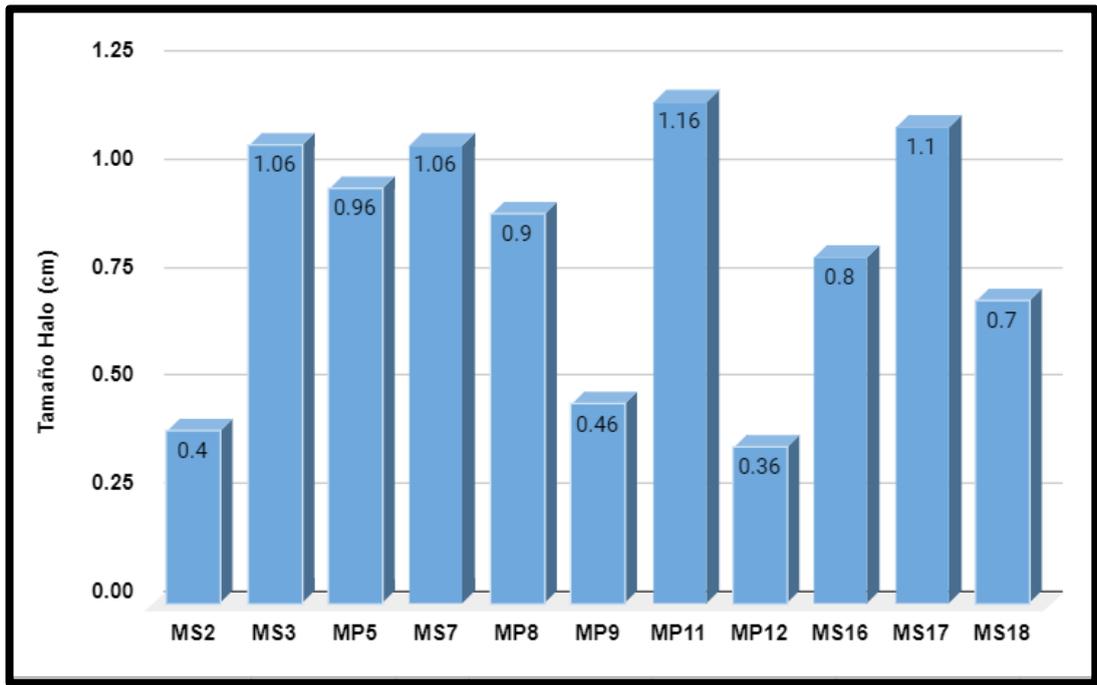


Figura 2. Barra de los resultados del tamaño de los halos

Tabla 5.

Análisis de varianza (ANOVA) con una significancia del 0.05%

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------|
| Entre grupos | 0.86727273 | 10 | 0.08672727 | 65535 |
| Dentro de los grupos | 0 | 0 | 65535 | |
| Total | 0.86727273 | 10 | | |

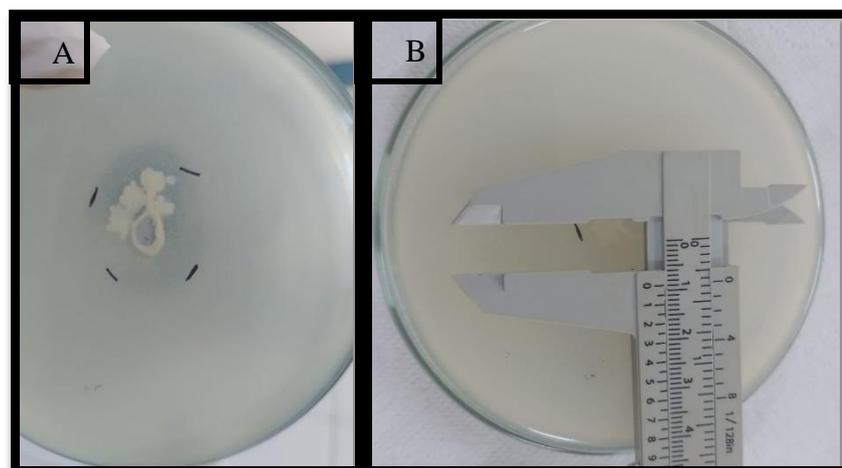


Figura 3. Halo del crecimiento bacteriano en medio (A) y medición del halo (B)

4.1.4 Producción de proteasas a nivel laboratorio

Se seleccionaron las dos mejores cepas (MP11 y MS17) para producir la proteasa a nivel laboratorio en el medio líquido ya descrito y su respectivo control (Figura 4).

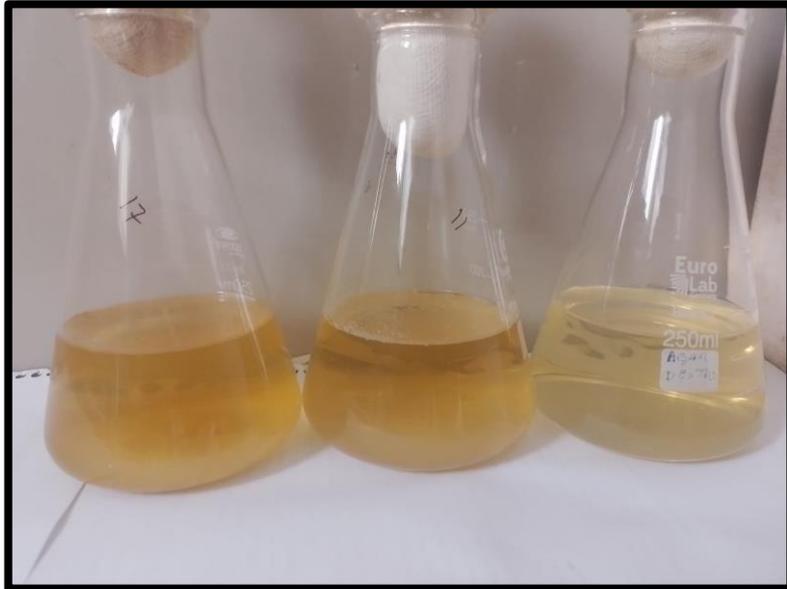


Figura 4. Muestras seleccionadas y su control en un medio específico para la producción de proteasas

4.1.5 Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas

Las muestras de las proteasas fueron cuantificadas teniendo como resultados mejores valores que el control positivo como se evidencia en la Figura 5.

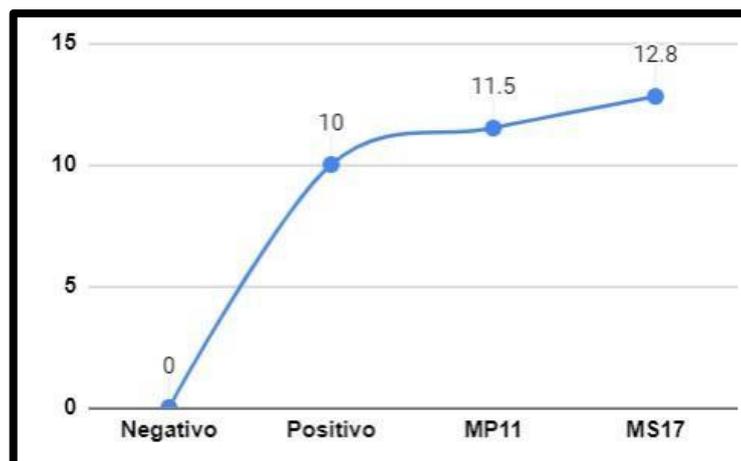


Figura 5. Resultado de la cuantificación en el espectrofotómetro

Capítulo V. Discusión

5.1 Discusión de resultados

En el presente trabajo se buscó aislar microorganismos nativos, por eso se logró aislar cepas nativas de *Bacillus sp.* al igual que las investigaciones como la de Aponte y Diaz (2011). En el estudio, se aíslan cepas de *Bacillus subtilis* que son fabricantes de proteasas partiendo de sembríos de caña chica. El objetivo principal es evaluar los factores idóneos de la actividad proteolítica de estas cepas con miras a su aplicación en la industria de detergentes. De igual modo Calvo et al. (2010) pudo aislar cepas de *Bacillus* obtenidas en muestras de rizósfericas de cultivo de papa de áreas altiplánicas. Al igual que Flores et al. (2011) aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* obtenidas en muestras de rizósfera, las cuales fueron extraídas en regiones céntricas del Perú. De igual manera, Huang et al. (2014), lograron aislar cepas de microorganismos partiendo de muestras de suelo de la Reserva Nacional de Tambopata. Para su investigación, seleccionaron cuatro cepas específicas, las cuales fueron identificadas como *Bacillus atrophaeus*, *B. pumilus* y *B. subtilis*. (Correa-Galeote et al. 2018)

Se detalla la variedad endofítica que impacta los suelos de cultivo de maíz en la ciudad de Acobamba, departamento de Huancavelica. En este contexto, se han identificado diferentes géneros de microorganismos. Entre ellos se encuentran *Staphylococcus sp.*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Chitinophaga* y *Bacillus*. Estos organismos endofíticos desempeñan un papel importante en la ecología del suelo e influyen en la salud y la productividad de las plantas de maíz en la región mencionada.

De las 11 cepas identificadas como *Bacillus sp.*, se evaluó su actividad proteolítica mediante el ensayo cualitativo de halo de proteólisis. Dos de estas cepas, MP11 y MS17, exhibieron los mayores diámetros de halo en los resultados obtenidos. Similarmente, siguiendo la metodología de Asha y Palaniswamy (2018), se aislaron 30 cepas, de las cuales 8 mostraron el mejor grosor de halo de proteólisis, aunque en este caso la actividad proteolítica se observó a pH ácido, en contraste con la actividad en este estudio. De manera análoga, Sánchez et al. (2004) aislaron un total de 26 cepas, cuyas 4 presentaron una mayor actividad proteolítica.

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se aislaron bacterias del género *Bacillus* fabricantes de proteasas, procedentes de campos de cultivo de la UNJFSC.
- Las bacterias producen proteasas que degradan la caseína y tienen buenos valores para un futuro uso industrial.
- Los aislado bacteriano Gram positivos codificados como MP11 y MS17, se resaltó por formar un diámetro de halo de hidrólisis de MS17 con 1.1milímetros y MP11 con 1.6 milímetros.

5.2 Recomendaciones

- Ampliar la cantidad de muestras bacterianas para buscar mejores bacterias productoras de proteasas.
- Optimizar los procesos y escalar a niveles mayores a 1L como se realizó en el proyecto, ya que estos productos se podrían aprovechar en el campo de la bioindustria.
- Se recomienda para futuros trabajos identificar por medio de metodologías de biología molecular las especies empleadas en el trabajo.

Capítulo VII. Referencias

7.1 Fuentes bibliográficas

- Adrio, J. & Demain, A. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules* 4(1), 117 – 139. doi: 10.3390/biom4010117
- Aponte, C.S. y Diaz, G.L. (2011). *Inhibidores de enzimas microbiales en la biodregradabilidad de detergentes* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Armstrong, F. B., & Bennet, T. P. (1986). *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverte.
- Asha, B. & Palaniswamy, M. (2018). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8(2), 119 – 127. doi: 10.7324/JAPS.2018.8219
- Boyce, S., & Tipton, K. (2005). Enzyme Classification and Nomenclature. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., & Zúñiga, D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(4), 899 - 906. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400008>
- Carranza, D.V. (2017). *Aislamiento y selección de cultivos nativos de Bacillus sp. productores de proteasas a partir de compost, Trujillo - Perú* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Castillo-Rodriguez, F. (2005). *Bioteología Ambiental*. Madrid, España: Tébar.
- Contesini, F.J., Rodriguez, R., & Sato, H.H. (2017). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology* 38(3), 321 - 334. doi: 10.1080/07388551.2017.1354354
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E.J., & Arone, G.J. (2018). Maize Endophytic Bacterial Diversity as Affected by Soil Cultivation History. *Frontiers in Microbiology* 9(484), 1- 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00484.

- Cuevas, C.V. (2021). *Enzimas xilanolíticas provenientes de microorganismos termófilos para aplicaciones industriales* (Tesis de pregrado). Universidad de Concepción, Chile.
- Flores, A., Egusquiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy J; Huerta, D., Jesus, Y., y Patiño, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Ciencia e Investigación* 14(1), 29 – 34.
- Gamarra, M.R. (2020). *Determinación de temperatura y pH para la optimización de la actividad proteolítica alcalina de Bacillus sp. aislados de tierras de cultivo de Zea mays* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Garate, A.W. (2016). *Obtención y caracterización de proteasas de excreción a partir de bacterias halófilas aisladas de las salineras de Maras* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco, Perú.
- Guevara, I.C. y Guido, N.J.X. (2017). *Selección de cepa de Bacillus Spp probiótica autóctona con mayor actividad enzimática*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 329121. doi: 10.1155/2013/329121
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Alya Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavenis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology* 100(13), 3366 – 3373. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.061.
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., & Jaouadi, B. (2018). Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological Macromolecules* 114, 1033 – 1048. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167

- Huang X; Zhou D; Guo J; Manter, D.K., Reardon, K.F., y Vivanco, J. (2014). *Bacillus spp.* From rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology* 118(3), 672 - 684. doi: 10.1111/jam.12720
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H.B., Manni, L., Agrebi, R., & Nasri, M. (2011). Alkaline protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry* 46(6), 1248 – 1256. doi: 10.1016/j.procbio.2011.02.012
- Laureano, F. (2020). *Producción y caracterización de un preparado enzimático producido por una bacteria de origen antártico (Flavobacterium sp. AU13)* (Tesis de pregrado). Universidad de la República, Uruguay.
- López-Otín C., & Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of Biological Chemistry* 283(45), 30433 - 30437. doi: 10.1074/jbc.R800035200
- Maughan, H., & Van Der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11(5), 789 – 797. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.001.
- Montes, L.I. (2020). *Caracterización bioquímica de la proteasa producida por Bacillus licheniformis LB04.* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo Leon, México.
- Mota, L.E. (2013). *Utilización de un medio enriquecido con melazas para la producción de biomasa de Bacillus licheniformis con potencial biofertilizante* (Tesis de Maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., & Syed, Q. (2007). Studies On Commercially Important Alkaline Protease From *Bacillus Lichniformis* N-2 Isolated From Decaying Organic Soil. *Turkish Journal of Biochemistry* 32(4), 171 – 177.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., & Weil, P.A. (2014). *Harper Bioquímica Ilustrada.* (J. De Leon-Fraga, Ed.), Igarss 2010 (28th ed.). China: The McGraw-Hill Companies.

- Najera, S. (2018). *Estudio de proteasas que degradan proteínas séricas humanas en cepas de bacterias gram negativas resistentes a antimicrobianos* (Tesis de doctorado). Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, México.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Parihar, R., & Dubey, S.K. (2017). Characterization of Protease Production Efficiency of Bacteria Present in the Poultry Farm Soil. *International Journal of Science and Research* 6(1), 2015 – 2018.
- Salazar, K.D. (2022). *Especies de la familia Bacillaceae productoras de proteasas aisladas de aguas termominerales del complejo turístico Baños del Inca, Cajamarca, Perú* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
- Sánchez, T., León, J., Woolcott, J. y Arauco, K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas marinas contaminadas con efluentes pesqueros. *Revista peruana de biología* 11(2), 179 – 186.
- Sawant, R., & Nagendran, S. (2014). Protease: An Enzyme With Multiple Industrial. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(6), 568 – 579.
- Sharmin, F., & Rahman, M. (2007). Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* strain FS-1. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, 6.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Kumar, P. (2016). Microbial Enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotechnology* 6(3), 174 – 189. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8
- Solorzano, L.I. (2018). *Producción de amilasas y proteasas por Bacillus sp. aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad - Perú* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17(2), 412 – 436. doi: 10.1111/1541-4337.12326

Whitman, W.B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology The Firmicutes*. (P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, W. B. Whitman, Eds.), Springer-Verlag New York Inc. (2nd ed.). USA: Springer.

Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schrenckenberger, P.C., & Woods, G.L. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color* (6th Ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.

7.2 fuentes electrónicas

Khan Academy (2023). Khan Academy. *Las enzimas y el sitio activo*. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/enzyme-structure-and-catalysis/a/enzymes-and-the-active-site>

Anexos

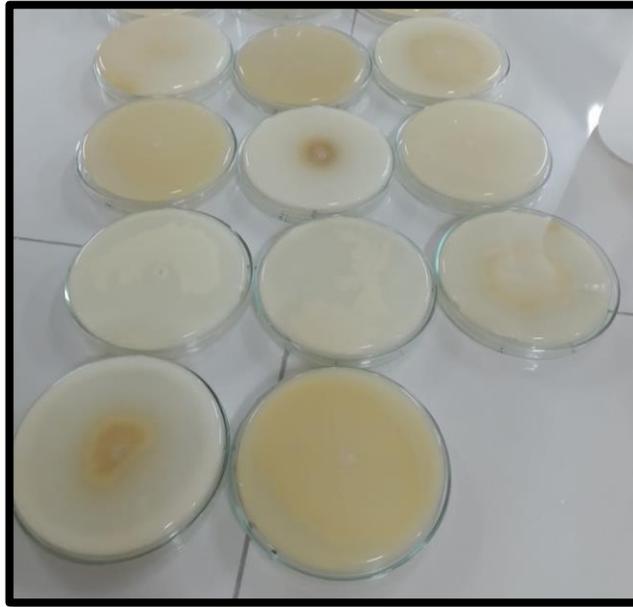
Anexo 1. Revisión del crecimiento de las bacterias en las placas



Anexo 2. observación de las bacterias al microscopio binocular



Anexo 3. Crecimiento de las bacterias en el medio agar nutritivo + leche descremada



Anexo 4. Resultados obtenidos de la medición de los halos de cada cepa

| Código | Tamaño Halo (cm) |
|---------------|-------------------------|
| MS2 | 0.4 |
| MS3 | 1.06 |
| MP5 | 0.96 |
| MS7 | 1.06 |
| MP8 | 0.9 |
| MP9 | 0.46 |
| MP11 | 1.16 |
| MP12 | 0.36 |
| MS16 | 0.8 |
| MS17 | 1.1 |
| MS18 | 0.7 |