

TESINA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
UN PREPARADO ENZIMÁTICO
PRODUCIDO POR UNA BACTERIA DE
ORIGEN ANTÁRTICO (*Flavobacterium*
sp. AU13)

FRANCO LAUREANO

Orientadora: Dra. Carolina Villadóniga

Co-orientadora: Dra. Susana Castro Sowinski

Tribunal: Dra. Silvana Alborés, Dr. Diego Vallés

Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Instituto de Química Biológica, Facultad de
Ciencias

Sección de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias

Abril, 2020

CONTENIDO

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Enzimas Proteolíticas.....	5
1.1.1. Clasificación	5
Proteasas serínicas	5
Proteasas cisteínicas	7
Proteasas aspárticas	7
Proteasas metálicas	7
1.1.2. Aplicaciones biotecnológicas de las proteasas	8
1.2. Enzimas producidas por microorganismos sicrófilos	10
1.3. Aplicaciones de las enzimas sicrófilas.....	12
1.4. Antecedentes	13
2. Hipótesis y objetivos	14
2.1. Hipótesis.....	14
2.2. Objetivo.....	14
2.2.1. Objetivo general	14
2.2.2. Objetivos específicos	14
3. Materiales y Métodos	15
3.1. Bacteria en estudio.....	15
3.2. Producción y almacenamiento del preparado enzimático extracelular.....	15
3.2.1. Determinación de actividad proteolítica	15
3.2.2. Cuantificación de proteínas	16
3.3. Identificación del preparado enzimático	16
3.3.1. GELATINA-PAGE Y Zimograma	16
3.3.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	17
3.3.3. Espectrometría de masas	17
3.4. Caracterización bioquímica del preparado enzimático producido por AU13	17
3.4.1. Efecto del pH en la actividad proteolítica	17
3.4.2. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica.....	18
3.4.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad	18
3.4.4. Efecto de inhibidores.....	18
3.5. Potencial uso biotecnológico del preparado enzimático	19

3.5.1.	EFFECTO DE TENSIOACTIVOS Y AGENTES OXIDANTES (COMPONENTES HABITUALES DE DETERGENTES) EN LA ACTIVIDAD DEL PREPARADO ENZIMÁTICO.....	19
3.5.2.	Efecto de detergentes de lavandería en la actividad del preparado enzimático	19
3.5.3.	Estabilidad del preparado enzimático en presencia de detergentes de lavandería	20
4.	Resultados.....	20
4.1.	Producción e identificación del preparado enzimático extracelular producido por <i>Flavobacterium</i> sp. AU13	20
4.2.	Caracterización del preparado enzimático de <i>Flavobacterium</i> sp. AU13.....	24
4.2.1.	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	24
4.2.2.	estabilidad térmica	25
4.2.3.	Efecto del pH en la actividad enzimática	26
4.2.4.	Efecto de algunos inhibidores en la actividad enzimática	26
4.3.	Evaluación de usos biotecnológicos	27
4.3.1.	Efecto de agentes surfactantes y oxidantes en la actividad enzimática	27
4.3.2.	Efecto de detergentes comerciales en la actividad y estabilidad de las proteasas del preparado.....	29
5.	Discusión	30
6.	Conclusión y perspectivas	34
	Bibliografía	35
	Anexos.....	39
	Anexo I - Medios de cultivo.....	39
	Anexo II - Soluciones de electroforesis de proteínas	39
	Anexo III – Buffer, soluciones y reactivos.....	40
	Anexo IV – Curva de Calibración del Método de Bradford con BSA	42
	Anexo V – Inhibidores de proteasas.....	42
	Anexo VI – Detergentes comerciales	43

Las peptidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos y participan en funciones esenciales en todos los organismos. Además de estas funciones fisiológicas, las peptidasas son utilizadas en distintos procesos biotecnológicos, siendo de gran relevancia en el mercado mundial de enzimas, con aplicaciones en la industria alimentaria, del cuero, de detergentes y farmacéutica. A menudo, el uso industrial de las peptidasas requiere que presenten alta actividad en condiciones extremas. Entre estas condiciones se encuentran las enzimas activas en frío, que presentan altos valores de constante catalítica (k_{cat}) a baja temperatura y termolabilidad permitiendo su inactivación a temperatura moderada. En este trabajo se caracterizó un preparado enzimático del aislado antártico *Flavobacterium* sp. cepa AU13, y se evaluó su potencial biotecnológico. La enzima mayoritaria del preparado enzimático, identificada mediante análisis de espectrometría de masas, es una proteína de 48 kDa que presentó fragmentos con alta identidad de secuencia con la epralisina de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, una metalopeptidasa extracelular alcalina que pertenece a la subfamilia de la serralisina. La acción de diferentes inhibidores confirmó que nuestra enzima es una metalopeptidasa. La actividad proteolítica fue máxima en un amplio rango de pH (pH 5-8) y mostró una temperatura óptima de 40°C, lo que sugiere que esta peptidasa extracelular es una enzima psicrófila. Estudios preliminares indicaron que la actividad de las enzimas presentes en el preparado enzimático son resistentes a la presencia de tensioactivos y oxidantes, sugiriendo un posible uso como aditivo en la formulación de detergentes. Las características y desempeño mostrado por estas enzimas refuerzan el interés en continuar estudiando su potencial como peptidasas de interés biotecnológico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Se denominan proteasas, enzimas proteolíticas o peptidasas a todas aquellas enzimas que actúan sobre proteínas u oligopéptidos, catalizando la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

La degradación de proteínas por parte de las proteasas es un paso fundamental en diversos procesos celulares, tales como la digestión con fines nutricionales, diferenciación celular, recambio de proteínas, morfogénesis, apoptosis y otros procesos celulares de gran relevancia. Tanto es así, que alteraciones en los procesos celulares, involucran a las proteasas en graves efectos patológicos como crecimiento de tumores, metástasis, etc. ¹.

1.1.1. CLASIFICACIÓN

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM) clasifica a las enzimas de acuerdo con la reacción que catalizan. En el caso de las proteasas, éstas se clasifican dentro del Grupo 3 (hidrolasas) y subgrupo 4 (actúan en los enlaces peptídicos). La Comisión de Nomenclatura de la IUBBM recomienda que a este tipo de enzimas se les denomine “peptidasas”.

Las peptidasas también se subclasifican en endopeptidasas y exopeptidasas según si realizan la hidrólisis en enlaces peptídicos ubicados internamente en la cadena polipeptídica o cerca de los extremos de la proteína, respectivamente. A su vez, las exopeptidasas se subclasifican en aminopeptidasas y carboxilopeptidasas, dependiendo de si actúan en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica o carboxilo-terminal, respectivamente ^{2,3}.

Según los aminoácidos o las moléculas involucradas en su mecanismo catalítico, estas enzimas se clasifican en proteasas serínicas, cisteínicas, metálicas, aspárticas, treonínicas o glutámicas, siendo las cuatro primeras las más comunes. En la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) se encuentra recopilada la información sobre las peptidasas, sus inhibidores, sustratos y correspondiente clasificación. Según esta base de datos, existe una clasificación jerárquica de las peptidasas en: clan, familia, tipo, con un identificador en cada nivel ⁴.

PROTEASAS SERÍNICAS

Las proteasas serínicas (EC 3.4.21) se denominan así debido a que la catálisis depende del oxígeno de la cadena lateral de un residuo de serina presente en el sitio activo, que actúa como nucleófilo atacando al carbono carbonílico del enlace peptídico a hidrolizar (Fig. 1.1.a). El sitio activo de estas enzimas se caracteriza por presentar una tríada catalítica compuesta por los residuos Ser-His-Asp, siendo la serina el residuo aminoácido que contiene el nucleófilo, la histidina el residuo aminoácido básico que desprotona el hidroxilo del residuo de Ser y el

aspartato el electrófilo (que orienta el anillo imidazol del residuo de His). También se han reportado otras tríadas catalíticas compuestas por Ser-His-Glu, Ser-His-His o diadas catalíticas como Ser-Lys/His ⁵. Este tipo de enzimas se inhiben de forma irreversible por varios compuestos, como por ejemplo el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las proteasas serínicas generalmente se activan a pH neutro y alcalino, y presentan un óptimo de actividad entre pH 7 y 11. Tienen baja especificidad de sustrato, y muchas tienen actividad esterolítica y amidasa. Presentan valores de masa molecular entre 18 y 35 kDa y sus puntos isoeléctricos están generalmente entre pH 4 y 6. La tripsina, quimotripsina y elastasa son ejemplos de peptidasas serínicas ¹.

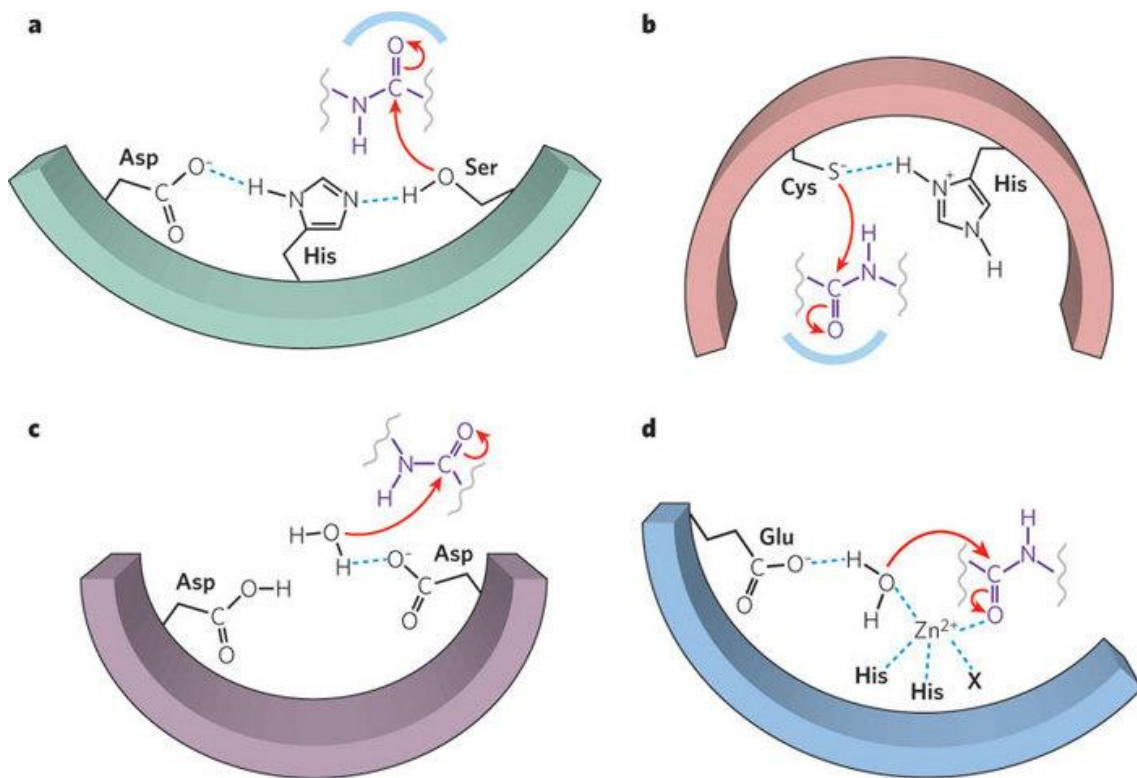


Figura 1.1. Principales mecanismos catalíticos: serínicas (a), cisteínicas (b), aspárticas (c) y metálicas (d). En los sitios activos de las proteasas serínicas y cisteínicas, el residuo catalítico generalmente se activa por la desprotonación mediada por un aceptor de protones (generalmente His) generando el nucleófilo que ataca al enlace a escindir. Las proteasas aspárticas y metálicas activan una molécula de agua para actuar como nucleófilo, en lugar de usar un grupo funcional de la enzima misma. Sin embargo, el proceso general de la escisión del enlace peptídico es esencialmente el mismo para todas las clases de proteasas ⁶.

PROTEASAS CISTEÍNICAS

Las proteasas cisteínicas presentan una díada catalítica compuesta por residuos de Cys-Hist donde la cadena lateral de la histidina tiene el rol de aceptor/dador de protones, siendo el nucleófilo el ion tiolato del residuo de cisteína (Fig. 1.1.b). En la reacción se forma un intermediario covalente con el sustrato, como ocurre en el mecanismo catalítico de las proteasas serínicas. Las peptidasas cisteínicas más estudiadas son las “tipo papaína”, que presentan actividad óptima a pH neutro, salvo algunas excepciones como las proteasas lisosomales que actúan a pH ácido. Otras representantes son: la clostripaína (heterodímero compuesto por una cadena liviana de 15.4 kDa y una cadena pesada 43 kDa; pH óptimo de actividad neutro - 7,2-7,8; punto isoeléctrico de 4,9), la streptopaína (monómero de 32 kDa, con un punto isoeléctrico a pH 8,4), la bromelina, cruzipaína y las caspasas, entre otras ^{1,2,7,8}.

PROTEASAS ASPÁRTICAS

En las proteasas aspárticas el ataque nucleofílico al enlace peptídico lo realiza una molécula de agua activada, en lugar de un grupo funcional de la enzima. Se denominan proteasas aspárticas o ácidas debido a que, en la mayoría de los casos, dos residuos de ácido aspártico del sitio activo activan una molécula de agua que actúa como nucleófilo. Estas proteasas presentan una estructura compuesta por dos dominios (dominios N- y C-terminal) y el sitio catalítico queda formado en el medio de estos. Los residuos de Asp que componen la díada catalítica están contenidos en el motivo Asp-Thr-Gly-Xaa presente en cada uno de los dominios. Se sugiere que el mecanismo catalítico implica una catálisis ácido-base general con una molécula de agua lítica que participa directamente en la reacción (Fig. 1.1.c) ^{1,2}.

Las proteasas aspárticas se dividen en cinco clanes y a su vez los clanes se subdividen en familias. Dentro de esta clasificación se encuentran las familias de la pepsina, la retropepsina, y enzimas de pararetrovirus. La mayoría de estas enzimas presentan actividad óptima a pH bajos (entre 3 y 4), presentando puntos isoeléctricos entre pH 3 y 4,5. Suelen tener un tamaño de 30 a 45 kDa. Todas las enzimas descritas hasta ahora y de este tipo catalítico son endopeptidasas, y se inhiben por pepstatina.

PROTEASAS METÁLICAS

Se denominan metaloproteasas a todas aquellas peptidasas que requieran un ion metálico divalente para ser activas. Las enzimas de este grupo pueden inactivarse por agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y EGTA (ácido etilenglicol tetracético), entre otros. En este caso, el ataque nucleofílico al enlace peptídico está mediado por una molécula de agua activada por el ion metálico, que generalmente es un ion zinc. Sin embargo, algunas familias de metaloproteasas requieren la presencia de dos iones metálicos que actúan co-catalíticamente. El ion metálico está coordinado por ligandos aminoacídicos, que en general son residuos de His, Glu, Asp o Lys. En la hidrólisis no se forma un intermediario covalente. Las proteasas metálicas se subdividen en 16 clanes. Como ejemplo de metaloproteasas se encuentra la termolisina perteneciente al clan MA, subclan MA(E), familia

M4. Las proteasas pertenecientes a este clan tienen una catálisis dependiente de zinc, y presentan un motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His, donde el Glu es el residuo catalítico y las dos His actúan como ligandos del zinc. A su vez, las proteasas del subclan MA(E) presentan un tercer ligando Glu por lo que son denominadas Glu-zincinas. En el caso de la termolisina, la proteasa presenta un motivo His-Glu-Leu-Thr-His como ligando al zinc. El residuo Glu166 C-terminal al motivo y una molécula de agua actúan como tercer y cuarto ligando al zinc (Fig. 1.1.d) ^{1,2,9,10}.

A su vez, dentro del clan MA, se encuentra el subclan MA(M). En este grupo de metalopeptidasas dos de los tres ligandos de zinc son residuos de histidina en un motivo "HEXXH". A diferencia del subclan MA (E), todos los miembros del clan son endopeptidasas, y el tercer ligando de zinc es una tercera histidina o un aspartato. En todas las familias del clan, excepto la familia M8, los ligandos de zinc se producen en el motivo extendido HEXXHXGX. Las endopeptidasas del subclan MA (M) se conocen como "met-zincinas" porque hay una metionina conservada que subyace al sitio activo en peptidasas en todas las familias, excepto M35 y M66.

La familia M10 es una de las familias más grandes en el subclan MA (M). Esta familia contiene metaloendopeptidasas extracelulares bacterianas y de origen eucariota con secuencias tan diversas que la familia se divide en tres subfamilias, la subfamilia M10A que contiene las enzimas eucariotas también conocidas como matrixinas, la subfamilia M10B que contiene las serralisinas bacterianas y la subfamilia M10C que contiene las fragilisinas bacterianas. Las tres subfamilias probablemente se originaron durante la evolución bacteriana temprana porque cada subfamilia contiene miembros bacterianos de peptidasas que están involucradas en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, incluidos los colágenos. La degradación de estos sustratos es necesaria para la remodelación y reparación del tejido, pero también ocurre en el daño patológico del tejido.

1.1.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS

Las proteasas tienen muchas potenciales aplicaciones biotecnológicas, siendo además una parte importante del mercado de enzimas de todo el mundo ¹¹. Estas enzimas se utilizan en industrias como la alimenticia, la textil, la fabricación de detergente y en medicina. Algunos ejemplos de posibles usos de las proteasas a nivel industrial y comercial son:

1) La industria textil utiliza proteasas que tienen como sustrato a la queratina o la elastina; por ejemplo, en la industria del cuero las proteasas se utilizan para la eliminación del pelo (depilado) como alternativa al depilado químico que genera efluentes contaminantes. Además, el tratamiento enzimático es una alternativa menos costosa a nivel energético, más segura y con mejores resultados que los procesos químicos. Las proteasas también se utilizan para cambiar la textura de los tejidos de algodón ¹².

2) En la industria alimentaria se utiliza la quimosina o renina (proteasa aspártica) para la elaboración de quesos. Esta enzima hidroliza a la κ -caseína de forma controlada, causando la desestabilización de las micelas de caseína y su precipitación. Luego de separar el suero (lactosuero) formado, el coágulo se procesa para obtener el queso. Estas enzimas de

coagulación de leche pueden tener varios orígenes. Las proteasas de origen animal se extraen del cuajo de estómagos de terneros recién destetados. Este cuajo contiene quimosina como principal agente de coagulación. En los últimos tiempos, debido a la necesidad de satisfacer la demanda del mercado, se realizaron varios esfuerzos para desarrollar sustitutos de la quimosina de origen animal. Esta demanda está parcialmente cubierta por proteasas de origen microbiano y la producción de quimosina recombinante. Estas dos presentan una mayor eficiencia en comparación a las de origen animal ^{1,11,13}. Últimamente, varias peptidasas de origen vegetal están siendo utilizadas en este proceso ¹⁴.

En la panificación, se utilizan endo y exoproteasas producidas por *Aspergillus oryzae*. Estas se utilizan para la modificación del gluten en la harina de trigo. Este tratamiento enzimático mejora las características de la masa, disminuye el tiempo de mezcla y aumenta el volumen del pan.

Algunas proteasas se utilizan en el proceso de la tiernización de la carne, hidrolizando controladamente las proteínas de las miofibrillas (como actina y miosina), y proteínas del tejido conectivo como elastina y el colágeno ^{1,11,14}.

Además, las proteasas se utilizan para generar péptidos bioactivos, que puedan incluirse en alimentos funcionales. Se denomina péptidos bioactivos a todos aquellos que actúen sobre una vía fisiológica. Dentro de éstos, los péptidos antihipertensivos son de especial relevancia pues constituyen una alternativa no farmacológica para la prevención y el control de la presión arterial. La mayoría de los péptidos antihipertensivos son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) ¹⁵.

3) Las proteasas se utilizan también en el tratamiento de residuos industriales y domiciliarios. Las proteasas queratinolíticas se utilizan en el tratamiento de las plumas residuales de la industria avícola así como también en el tratamiento de tuberías obstruidas por cabello ¹¹.

4) Otro proceso industrial menos conocido es el posible uso de proteasas en el desgomado de la seda. La utilización de tratamientos enzimáticos en este proceso disminuiría su costo ¹¹.

5) En la industria de los detergentes, se utilizan proteasas para la remoción de manchas proteicas, efecto que no se podría obtener mediante tecnologías utilizadas en detergentes convencionales. Desde diferentes sectores industriales, se ha impulsado el desarrollo de nuevos procesos enzimáticos que cumplan con las necesidades del consumidor en cuanto a mejorar la limpieza, el cuidado de las prendas y obtener efectos antimicrobianos. Sin embargo, para utilizarse a nivel industrial, la actividad de estas enzimas debe ser compatible con los otros componentes que integran el detergente, como son los agentes surfactantes, perfumes y agentes blanqueadores oxidantes. Además, las proteasas incluidas en los detergentes deben ser activas en las condiciones de pH y temperatura esperados durante un lavado convencional. Específicamente, existe interés en las proteasas que puedan actuar a temperaturas bajas. Las demandas actuales de los consumidores y el mayor uso de fibras sintéticas, que no pueden tolerar altas temperaturas, han cambiado los hábitos de lavado hacia el uso de lavados a bajas temperaturas. Esto, ha llevado a los productores de enzimas a buscar nuevas enzimas que puedan actuar a bajas temperaturas, una característica que no solo reduce los costos

energéticos del calentamiento del agua durante el proceso de lavado, sino que hace más eficiente la limpieza con el producto comercial ^{11,16-18}.

1.2. ENZIMAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS SICRÓFILOS

Es posible clasificar a los microorganismos según su temperatura óptima de crecimiento en cuatro grandes grupos: a) los microorganismos sicrófilos y sicrotolerantes, con temperaturas óptimas de crecimiento bajas (por ejemplo, *Polaromonas vacuolata* que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 4 °C); b) los microorganismos mesófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento moderadas (por ejemplo, *Escherichia coli* con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C); c) los microorganismos termófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento altas (por ejemplo, *Geobacillus stearothermophilus* con una temperatura óptima de crecimiento entre 55 a 65 °C) y; c) por último, los microorganismos hipertermófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento muy altas (por ejemplo, *Pyrolobus fumarii* con una temperatura óptima de crecimiento de 106 °C) ¹⁹⁻²².

Algunos autores afirman que los microorganismos sicrófilos son aquellos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el entorno de 15 °C, siendo capaces de crecer entre 0°C y 20°C ²³. En cambio, se denominan organismos sicrotolerantes, a aquellos que son capaces de crecer a bajas temperaturas, pero que presentan temperaturas óptimas de crecimiento superiores a los 20 °C. Ambos tipos de microorganismos cuentan con adaptaciones particulares que los hacen capaces de sobrevivir en ambientes fríos, como puede ser el continente Antártico.

Una de las adaptaciones bioquímicas presentes en los microorganismos sicrófilos y sicrotolerantes, es la síntesis de enzimas adaptadas a las bajas temperaturas (enzimas sicrófilas). Estas enzimas presentan un alta constante catalítica a bajas temperaturas (temperatura óptima de actividad en el entorno de los 40 °C), comparado con sus homólogas mesófilas (temperatura óptima de actividad en el entorno de los 60 °C) (Fig. 1.2). Las enzimas sicrófilas presentan una menor estabilidad a temperaturas moderadas en comparación a sus enzimas homólogas mesofílicas y termofílicas ²⁴. Esta diferencia de estabilidad está relacionada con la sustitución de algunos aminoácidos que las hacen más flexibles. Las adaptaciones estructurales fuera del sitio activo afectan en las propiedades dinámicas de los residuos catalíticos optimizando la actividad catalítica en frío. También se ha comprobado, mediante estudios estructurales por difracción de rayos X que, en algunos casos, el sitio activo parece ser más grande y accesible para los ligandos en las enzimas sicrófilas que en las enzimas mesofílicas. Esto podría explicar la característica pérdida de actividad de estas enzimas a temperaturas moderadas (Fig. 1.3) ^{25,26}.

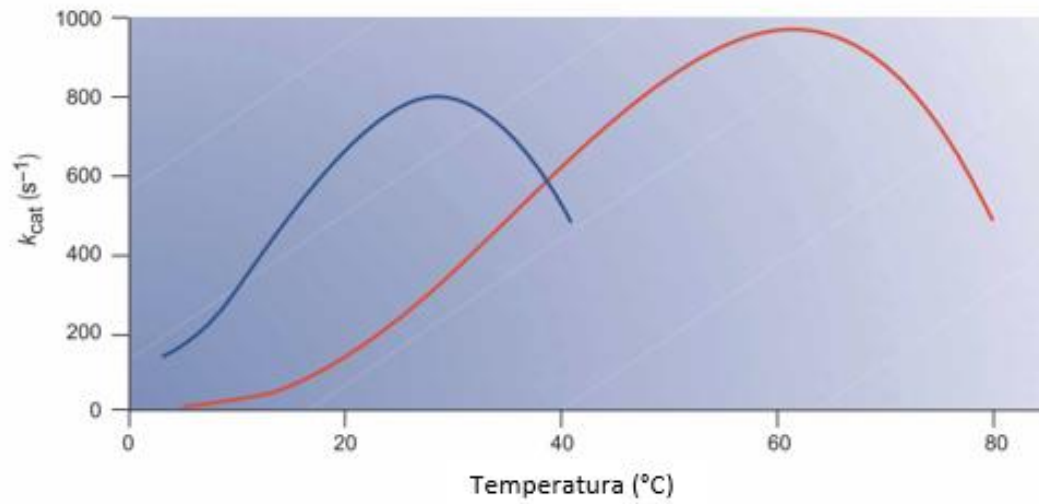


Figura 1.2. Actividad enzimática en función de la temperatura. Las enzimas sicrófilas (azul) son hasta diez veces más activas a temperaturas bajas y moderadas (20-30 $^{\circ}C$) que sus homólogos mesófilos (rojo) ²⁵.

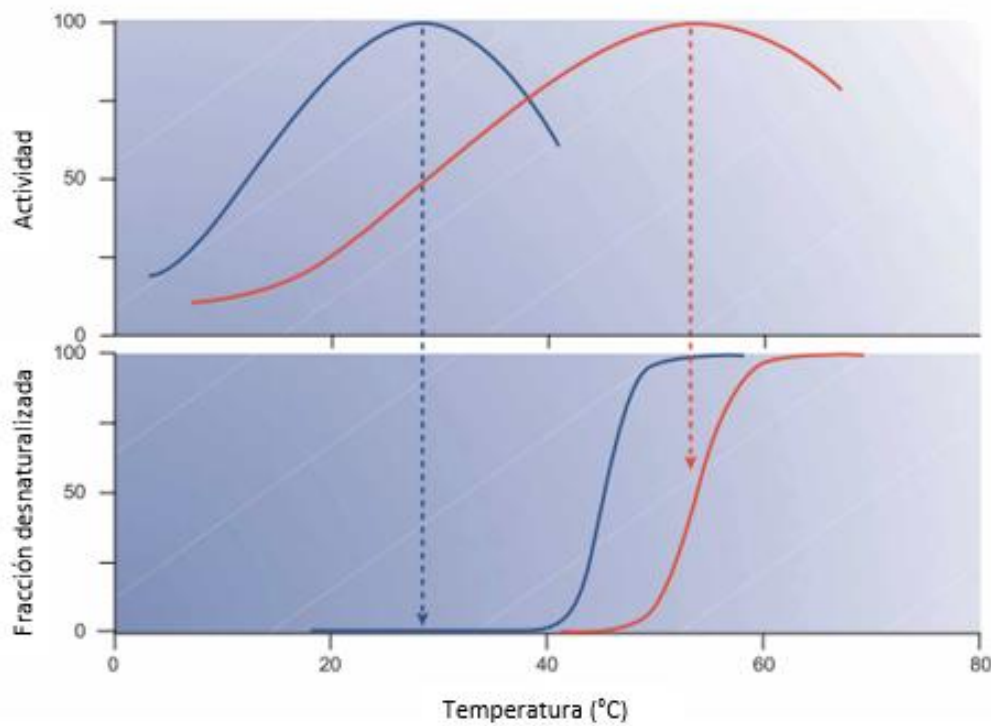


Figura 1.3. Termolabilidad de las enzimas sicrófilas. Las enzimas sicrófilas (panel superior, azul) son inactivadas por un aumento moderado de la temperatura antes de desnaturalizarse (panel inferior). Por el contrario, la inactivación de las enzimas mesófilas (rojas) está estrechamente relacionada con la pérdida de la conformación proteica.

La biotecnología moderna, dirigida al diseño de protocolos amigables con el medio ambiente y al mismo tiempo económicamente rentable, debe actualizarse continuamente. Para mejorar los procesos, generalmente se piensa en modificaciones químicas o genéticas de los biocatalizadores, o la alteración de las condiciones de reacción, pero también mediante la utilización de nuevas enzimas que presenten una alta actividad en condiciones ambientales extremas, y a menudo maximizando la eficiencia de estos procesos ²⁷. En este contexto, el uso de enzimas psicrófilas está tomando un gran impulso dentro de las industrias, y los investigadores están realizando esfuerzos en la búsqueda de enzimas novedosas activas a bajas temperaturas.

1.3. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS SICRÓFILAS

La gran diversidad de microorganismos psicrófilos/sicrotolerantes y su capacidad de sintetizar enzimas activas a bajas temperaturas hacen de éstos una novedosa fuente de material genético con potenciales usos biotecnológicos. La capacidad de estas enzimas de presentar una alta actividad a bajas temperaturas permite su aplicación en ciertos procesos industriales a temperatura ambiente con alta eficiencia, siendo alternativas potencialmente valiosas a sus contrapartes mesófilas, pudiéndose aplicar en tratamientos enzimáticos a temperaturas bajas evitando así alterar la calidad del producto. Además, la característica termo-sensibilidad de estas enzimas hace posible inactivarlas rápidamente, lo cual puede ser ventajoso en algunos procesos industriales, en donde la reacción enzimática debería limitarse en el tiempo para evitar una acción excesiva o perjudicial ^{28,29}.

Son claros los beneficios de la utilización de enzimas activas a bajas temperaturas a nivel industrial y doméstico. Existen procesos claves en los que se pueden explotar los beneficios de estas enzimas. Como ejemplos domésticos, el lavado de ropa a bajas temperaturas no solo resulta en un ahorro energético, sino que además se protege el color de los tejidos. Generalmente, las enzimas que se agregan a los detergentes para eliminar las manchas (proteasas, lipasas y glicosidasas) son poco activas a temperatura ambiente y la utilización de enzimas psicrófilas puede mejorar la eficiencia de lavado en esas condiciones. El mercado de enzimas como proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, que se usan comúnmente como aditivos en detergentes, representa aproximadamente el 40% de la venta total de enzimas. En esta área, ya se han presentado varias patentes que involucran enzimas psicrófilas de origen bacteriano ^{25,29}.

En la industria alimentaria, la utilización de enzimas psicrófilas permitiría la transformación de productos sensibles al calor. Existen ejemplos que han sido reportados, como la eliminación de lactosa en la leche por acción de β -galactosidasas psicrófilas durante el almacenamiento en frío con la finalidad de mejorar su digestibilidad y la dulzura de la leche ^{25,29}.

Por último, las bajas temperaturas también pueden favorecer la reacción de síntesis de enlaces peptídicos haciendo que el agua presente en el medio de reacción se nucleee. Luego, el agua, que es un nucleófilo, se vuelve menos competitiva al aceptar el grupo acilo, que desplaza el

equilibrio de la reacción hacia la síntesis de enlaces peptídicos. Aunque la literatura provea varios ejemplos de proteasas psicrófilas para la síntesis de péptidos, varios autores aún utilizan proteasas mesófilas comerciales como la quimotripsina que no son adecuadas para trabajar en frío ²⁷.

1.4. ANTECEDENTES

Desde el año 2008, el grupo de investigación de la Dra. Susana Castro trabaja en proyectos relacionados al aislamiento e identificación de bacterias psicrófilas y psicrotolerantes con potenciales aplicaciones biotecnológicas. En este contexto se han obtenido varios aislamientos bacterianos productores de proteasas, de origen Antártico, identificados como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* y *Flavobacterium* ³⁰, y en algún caso se ha logrado producir en forma recombinante y caracterizar las propiedades bioquímicas de estas proteasas activas a bajas temperaturas ³¹.

Por otro lado, el Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, a través de la Dra. Carolina Villadóniga ha desarrollado trabajos focalizados en la purificación, caracterización bioquímica y búsqueda de aplicaciones de proteasas de origen vegetal para la obtención de péptidos bioactivos ³².

Durante esta pasantía de grado se trabajará con el aislamiento de *Flavobacterium* sp. AU13, una cepa de origen Antártico, perteneciente a la colección de microorganismos Antárticos de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias (laboratorio de la Dra. S. Castro). AU13 crece y produce proteasas extracelulares en un rango de temperaturas de entre 4 °C y 18 °C, según se evidenció mediante la producción de un halo de hidrólisis al cultivar la cepa en un medio de cultivo sólido suplementado con leche ³⁰.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Basados en el potencial de producción de enzimas con actividad proteolítica de *Flavobacterium* sp. AU13 (tesina de grado de la Mag. Cecilia Martínez-Rosales) nos propusimos la siguiente hipótesis: El microorganismo de origen antártico, *Flavobacterium* sp. AU13, es capaz de producir enzimas con actividad proteolítica en medio de cultivo líquido. Estas enzimas serían activas a bajas temperaturas y tendrían un potencial uso biotecnológico.

2.2. OBJETIVO

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de productos biotecnológicos a través del uso de enzimas activas a bajas temperaturas.

Adquirir entrenamiento en técnicas de microbiología y bioquímica tomando como objeto de estudio una enzima de potencial relevancia industrial.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir la/as proteasa/as extracelular/es a partir de un microorganismo Antártico.
- Determinar cuántas proteasas hay presentes en el secretoma del microorganismo elegido e identificarlas por espectrometría de masas.
- Determinar temperatura y pH óptimos de actividad del preparado enzimático.
- Estudiar la estabilidad del preparado enzimático a diferentes temperaturas.
- Determinar el tipo de mecanismo catalítico del preparado enzimático mediante la utilización de inhibidores específicos para cada tipo catalítico.
- Determinar la actividad del preparado enzimático frente a agentes tensoactivos y oxidantes.
- Evaluar la actividad proteolítica en presencia de detergentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. BACTERIA EN ESTUDIO

La bacteria utilizada durante esta tesina de grado fue aislada por Cecilia Martínez-Rosales a partir de una muestra de agua recolectada de la cañada ubicada al este de la Base Científica Gral. Artigas (península Fildes, Isla Rey Jorge, Shetlands del Sur), en la Antártida (62° 11'4" S, 58° 51'7" W).

La cepa productora de proteasas extracelulares mediante la utilización de un medio diferencial agar-leche, se identificó como un miembro del género *Flavobacterium* por amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA ³⁰.

3.2. PRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL PREPARADO ENZIMÁTICO EXTRACELULAR

El microorganismo se cultivó en 3 mL de medio líquido Luria Bertani (LB, Anexo I) a 16 °C y 160 rpm, durante toda la noche. Se tomaron 2 mL de este pre-cultivo y se inocularon 200 mL (en matraz de 1 L) de medio LB diluido 20 veces, suplementado con leche en polvo descremada al 5% (p/v) (medio LBL; ver Anexo I). El cultivo se creció a 16 °C con agitación a 200 rpm hasta que se evidenció la coagulación de las proteínas lácteas. Una vez observado el coágulo, se sedimentaron las células por centrifugación a 6654 x g (Centrífuga Beckman J2-21) por 35 min a 10 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana con tamaño de poro de 0,45 µm para obtener un sobrenadante o extracto libre de células que se fraccionó y almacenó a -20 °C.

Se liofilizó el extracto libre de células en fracciones de 10 mL durante 2 días, utilizando un liofilizador de mesa (Labotecgroup.com, modelo 0.1JLG; 12FD). Para los estudios posteriores, cada fracción se suspendió en 2 mL de buffer fosfato de sodio 0,2 M, pH 6.

3.2.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica se determinó por el método descrito por Andrews y Asenjo ³³, utilizando azocaseína como sustrato. El método se basa en la detección de la actividad proteolítica usando un sustrato proteico cromógeno (azocaseína). La acción de las enzimas producirá azopéptidos pequeños que permanecerán solubles en el sobrenadante producido luego de precipitar la azocaseína no hidrolizada. Los azopéptidos liberados por acción de las enzimas pueden detectarse a 337 nm.

Se incubaron 340 µL de azocaseína al 1% (p/v) con 340 µL de buffer fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,5 (buffer de actividad, Anexo III) durante 10 min a 37 °C. Se agregaron 340 µL del preparado

enzimático y se incubó a 37 °C hasta tiempo final. La reacción se detuvo con el agregando de 340 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) y se incubó 20 min a 37 °C. Se centrifugó por 30 min a 13200 x g, a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 337 nm. Una unidad de enzima (UE) se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir el aumento de una unidad de absorbancia medida a 337 nm ($A_{337 \text{ nm}}$), bajo las condiciones experimentales.

Para establecer el tiempo de reacción en el que se cumplen las condiciones de velocidad inicial, se realizó el ensayo de actividad deteniendo la reacción a diferentes tiempos (en el rango de 10 a 60 min). Se graficó la $A_{337 \text{ nm}}$ en función del tiempo de reacción y se determinó el rango de tiempo en el que se mantiene la relación lineal.

3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación proteica se realizó mediante el método de Bradford, utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de concentración de 0,1 a 1,0 mg/mL³⁴.

En una placa de 96 pocillos se colocaron 10 µL de muestra o estándar (Seroalbúmina Bovina, BSA) por pocillo y se adicionaron 140 µL de reactivo de Bradford (Anexo III). Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm en lector de placas Infinite 200 Pro (Tecan®). Se graficó la absorbancia en función de la concentración de BSA (Anexo IV). Los valores de concentración proteica de las muestras se obtuvieron por interpolación en este gráfico.

3.3. IDENTIFICACIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO

3.3.1. GELATINA-PAGE Y ZIMOGRAMA

Para identificar que proteínas en el secretoma de AU13 presentan actividad proteolítica, se realizó un zimograma, según se describe a continuación.

Se realizó una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida co-polimerizada con gelatina 0,1 % (p/v). El gel consistió en un gel concentrador (T= 4%) y un gel separador (T= 7,5%) (ver Anexo II). Se sembraron 15 µg de proteína por pocillo, diluidas en buffer de muestra (Anexo III). La separación electroforética se realizó en una cuba Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad), utilizando buffer de corrida con SDS (Anexo III), a 20 mA por gel, durante 60 min a 4 °C. El zimograma se lavó con buffer de actividad conteniendo Tritón 2,5 % (v/v) por 1 h a temperatura ambiente, con agitación. Luego se incubó en buffer de actividad por 24 h a 30 °C. El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 y las bandas con actividad proteolítica se detectaron por la producción de zonas de clarificación en el gel (bandas sin color, donde la proteasa hidrolizó la gelatina copolimerizada) sobre un fondo azul.

3.3.2. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

Para identificar las proteínas presentes en el preparado enzimático, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La muestra se analizó mediante SDS-PAGE como agente desnaturalizante (SDS-PAGE). El gel estaba compuesto por un gel concentrador (4%) y un gel separador (12%) (Anexo II). Se utilizó buffer de muestra reductor y desnaturalizante con SDS (Anexo III). La fracción de la muestra liofilizada fue posteriormente gelfiltrada con una columna P-10 (Sephadex G25). Se sembraron 19 y 29 µg de muestra, previamente calentada en baño de agua a 100 °C por 10 min. A su vez, se sembraron 19 y 29 µg de liofilizado de AU13 gelfiltrado. Como marcador de peso molecular se utilizó MWM1 (66, 45, 24, 20,1 y 14,2 kDa); MWM2 (66 y 14,2 kDa) y MWM3 (45, 24 y 20,1 kDa). La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA por los primeros 10 min y luego a 20 mA por los siguientes 60 min.

Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie R-250 (Anexo II) y posterior decolorado con solución de etanol y ácido acético (Anexo II).

3.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La banda proteica seleccionada del SDS-PAGE se analizó en el servicio de espectrometría de masas del UByPA, Institut Pasteur de Montevideo. La muestra fue sometida a una digestión trípica y los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas utilizando un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems), por medio de la disociación inducida por colisión de los péptidos seleccionados en experimentos MS/MS. Los resultados del espectro obtenido fueron analizados en distintos bancos de datos para identificar si estos presentan homología con secuencias de otras proteínas. Los datos de este servicio se utilizaron para la identificación primaria del preparado enzimático en estudio.

3.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL PREPARADO ENZIMÁTICO PRODUCIDO POR AU13

Se realizaron estudios para determinar las condiciones óptimas de actividad (pH y temperatura), se analizó el efecto de diferentes agentes en la actividad proteolítica.

3.4.1. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para estudiar cómo afecta el cambio de pH a la actividad enzimática, se ensayó la actividad proteolítica, como se describió en la sección 3.2.1, sustituyendo el buffer de actividad por el sistema buffer descrito por Ellis y Morrison³⁵ en el rango de pH de 4 a 9 (Anexo III). Se eligió el buffer Ellis y Morrison debido a que con un mismo buffer se cubre un amplio rango de pH sin

cambiar la naturaleza química y la fuerza iónica para cada pH a analizar. Se realizaron triplicados para cada pH y se graficaron los valores de actividad relativa en función del pH, tomando como 100 % la actividad máxima registrada.

3.4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

El efecto de la temperatura en la actividad se determinó utilizando el método que se describió en la sección 3.2.1, a pH 6, a distintas temperaturas de reacción en el rango de 15 a 60 °C, con intervalos de 5 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado y se graficó la actividad relativa en función de la temperatura, tomando como 100% la actividad máxima registrada.

3.4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD

Se estudió como afecta la temperatura a la estabilidad de las enzimas presentes en el preparado enzimático. El preparado se incubó a 25 y 40 °C durante 5 horas, se determinó la actividad, según se describió en la sección 3.2.1, y se calculó la actividad remanente (%) tomando como 100 % la actividad inicial del preparado. Las mediciones se tomaron por triplicado y se graficó la actividad remanente en función del tiempo.

3.4.4. EFECTO DE INHIBIDORES

Para determinar a qué grupo catalítico pertenecen las proteasas presentes en el preparado enzimático en estudio, de acuerdo a los tipos catalíticos propuestos por Barrett & Rawlings, se midió la actividad proteolítica luego de incubar el preparado enzimático con diferentes inhibidores ³⁶. Las principales características de los inhibidores y el tipo de sitio catalítico que inhiben se muestran en el Anexo V.

El preparado enzimático (0,15 UE) se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con los inhibidores seleccionados.

Luego de la incubación se determinó la actividad proteolítica como se describió en la sección 3.2.1. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición respecto al control. Se consideró como 100 % de actividad proteolítica, al valor obtenido del ensayo en ausencia de inhibidores.

3.5. POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO DEL PREPARADO ENZIMÁTICO

Se analizó la potencialidad de las peptidasas presentes en el preparado enzimático como aditivo para la industria de los detergentes.

3.5.1. EFECTO DE TENSIOACTIVOS Y AGENTES OXIDANTES (COMPONENTES HABITUALES DE DETERGENTES) EN LA ACTIVIDAD DEL PREPARADO ENZIMÁTICO

Se determinó cuál es el efecto de diferentes tensoactivos sobre la actividad del preparado enzimático (0,05 UE) en presencia de diferentes detergentes de laboratorio (Tween 20 %, Tween 80 % y Triton X 100) a concentraciones finales de 7 y 20 % (v/v).

A su vez, se determinó el efecto de oxidantes en la actividad utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a concentraciones finales: 3, 10, 20 y 50 % (v/v). La concentración de la solución stock de peróxido de hidrógeno se controló mediante espectrometría ($\lambda = 240 \text{ nm}$ $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) Se realizó un control sin el agregado de detergente u oxidante, el cual se consideró que tenía el 100 % de actividad.

Se determinó la actividad proteolítica como se describió en la sección 3.2.1. Para esto se preparó una solución enzimática con las concentraciones de detergente o peróxido de hidrógeno anteriormente mencionadas a la cual se le determinó la actividad. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad relativa respecto al control ^{17,31}.

3.5.2. EFECTO DE DETERGENTES DE LAVANDERÍA EN LA ACTIVIDAD DEL PREPARADO ENZIMÁTICO

Se determinó la actividad del preparado enzimático en presencia de diferentes detergentes comerciales (Ariel®, Nevex® Matic, Nevex® Vivere, Persil®, Skip® White y Skip® Black). Se prepararon soluciones al 1 % (p/v o v/v) de los detergentes, estas se congelaron durante 24 h y se trataron a 100 °C por 15 min para inactivar las enzimas que pudieran contener. Esto evita la interferencia por posibles enzimas que contenga el detergente de fábrica. Las soluciones de detergentes inactivadas se mezclaron con el liofilizado disuelto en buffer de actividad (0.04 UE), resultando una solución 0,5 % (concentración final) de los detergentes. Se determinó la actividad proteolítica como se describió en la sección 3.2.1. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como actividad relativa (%) respecto al control sin detergente.

3.5.3. ESTABILIDAD DEL PREPARADO ENZIMÁTICO EN PRESENCIA DE DETERGENTES DE LAVANDERÍA

El preparado enzimático (0,04 UE) se incubó durante 1 h a 25 °C con los mismos detergentes comerciales y en las mismas concentraciones que en el ensayo descrito en 3.5.2. Luego de la incubación se determinó la actividad proteolítica como se describió en la sección 3.2.1. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad residual respecto al control sin detergente.

4. RESULTADOS

4.1. PRODUCCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO EXTRACELULAR PRODUCIDO POR *Flavobacterium* sp. AU13

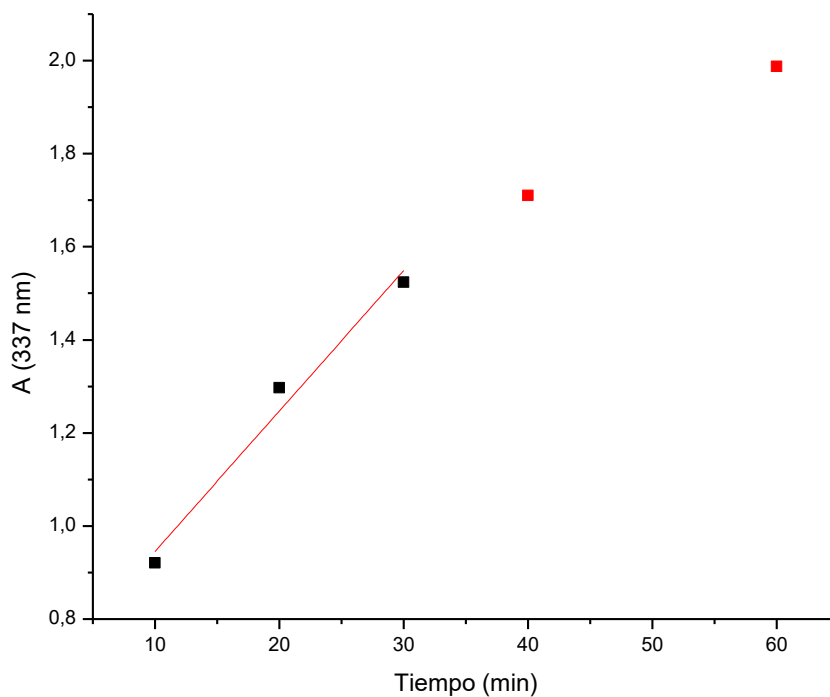
El trabajo se inició con el estudio sobre la viabilidad de producir las enzimas de interés en medio de cultivo líquido y además determinar cuál era el tiempo necesario para detectar la producción de las enzimas.

El cultivo de *Flavobacterium* sp. AU13, crecido en medio líquido suplementado con leche, mostró coagulación de las proteínas lácteas a los 11 días de incubación a 16 °C, evidenciando la secreción de proteínas con actividad proteolítica.

Luego de obtenido el sobrenadante libre de células, se cuantificó su actividad proteolítica y concentración de proteínas. El método de determinación de actividad proteolítica (método de Andrews y Asenjo) utilizado, es un método a punto final, por lo que fue necesario evaluar en que rango de tiempos de reacción se está trabajando en condiciones de velocidad inicial. Como se observa en la Figura 4.1, en las condiciones del ensayo, la reacción mantiene condiciones de velocidad inicial a tiempos menores a los 30 min de reacción. De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar 30 min como tiempo final de la reacción enzimática.

Teniendo en cuenta las consideraciones arriba expuestas, se determinó que el sobrenadante libre de células presentaba una actividad de $0,020 \pm 0,003$ U/mL. La concentración de proteína de la muestra fue de $1,5 \pm 0,1$ mg/mL.

Para aumentar la concentración proteica y mejorar las condiciones de almacenamiento (reducción del tamaño de muestra a almacenar), se concentró el extracto libre de células por liofilización. El liofilizado y disuelto en un volumen de buffer cinco veces menor al de la muestra antes de liofilizar, mostró una concentración de enzima activa casi 20 veces mayor ($0,37 \pm 0,07$ U/mL) y una concentración de proteína casi cinco veces mayor ($6,7 \pm 0,1$ mg/mL). El aumento de la actividad enzimática muy superior a la esperada podría deberse al aumento de la concentración de componentes presentes en el extracto que pudieran actuar como activadores de las peptidasas.



Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,00374		
Adj. R-Square	0,95975		
		Value	Standard Error
B	Intercept	0,6434	0,09346
B	Slope	0,0301	0,00433

Figura 4.1 – Determinación de las condiciones de velocidad inicial. Se graficó la absorbancia a diferentes tiempos de reacción.

Para evaluar si el microorganismo secreta una o varias enzimas con actividad proteolítica, se realizó una electroforesis nativa copolimerizada con gelatina y un revelado específico para proteasas (zimograma). Los resultados mostrados en la Figura 4.2, carril 1, revelan la presencia de al menos dos bandas proteicas con actividad proteolítica, siendo la banda con mayor migración electroforética la que manifiesta una mayor intensidad equivalente a la actividad proteolítica. No se observan bandas de hidrólisis en el carril de la BSA (control negativo, figura 4.2, carril 5). Por el contrario, sí se observa una banda de hidrólisis en el carril de la termolisina (control positivo, figura 4.2, carril 3).

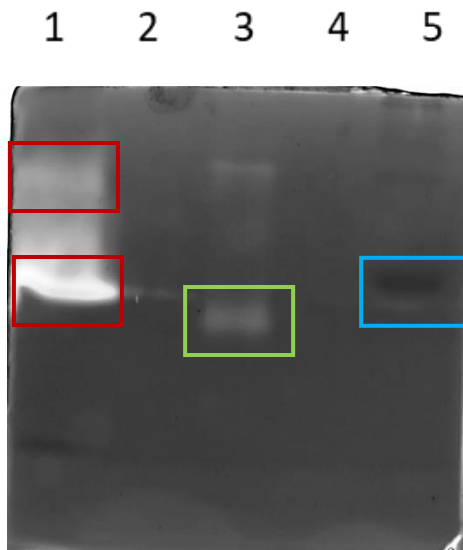


Figura 4.2 - Zimograma en gel de poliacrilamida co-polimerizada con gelatina 0,1 % (p/v). Las bandas claras evidencian actividad proteolítica en la gelatina.

En el pocillo 1 (rojo) se sembró el extracto libre de células (15 μg de proteína), en 3 (verde) se sembró termolisina (1 μg de proteína) como control positivo y en el carril 5 (celeste) se sembró seroalbúmina bovina (15 μg de proteína) como control negativo.

El perfil de proteínas secretadas por AU13, y separadas mediante SDS-PAGE del sobrenadante libre de células, se muestran en la figura 4.2. En los carriles 5, 6, 7 y 8 se observa las proteínas del sobrenadante de AU13 donde se identifica una banda a 48 kDa que podría corresponder a la proteína proteína de interés (Figura 4.3).

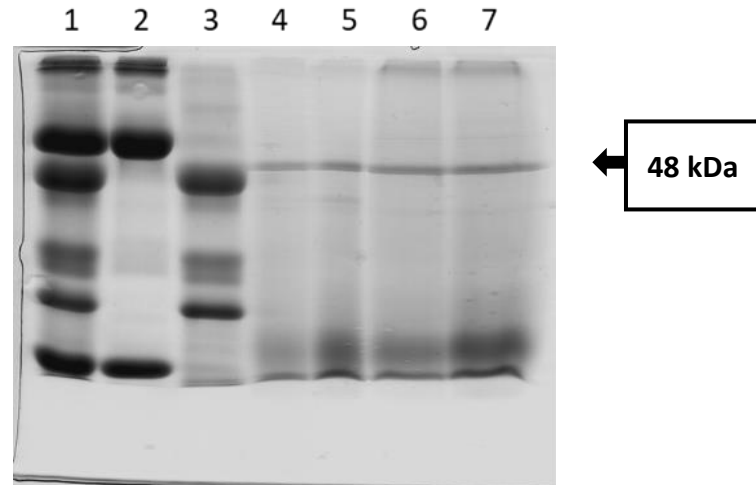


Figura 4.3 – Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) del sobrenadante libre de células.

En carril 1: MPM1 (66, 45, 24, 20,1 y 14,2 kDa); carril 2: MPM2 (66 y 14,2 kDa); carril 3: MPM3 (45, 24 y 20,1 kDa); carriles 4 y 5: liofilizado de AU13 gelfiltrado (19 y 29 µg, respectivamente); carriles 6 y 7: liofilizado de AU13 (19 y 29 µg, respectivamente); MPM significa – marcador de peso molecular

Para saber la identidad de la banda proteica de aproximadamente 48 kDa, y si se corresponde a una proteasa, se realizó una identificación inicial de la misma, por mapeo peptídico. Este estudio reveló que la mejor coincidencia, según su comparación con las proteínas depositadas en la base de datos, fue con una epralisina (metaloproteasa alcalina extracelular de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1) (Fig. 4.4). De acuerdo con los resultados, se encontraron tres fragmentos peptídicos que coincidieron con fragmentos de la secuencia de la epralisina, pero solo uno de ellos tuvo una coincidencia estadísticamente significativa.

Protein hits : [gi|77458903](#) epralysin [*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1]
[gi|296138753](#) integrase [*Tsukamurella paurometabola* DSM 20162]
[gi|294934066](#) hypothetical protein Pmar_PMAR018009 [*Perkinsus marinus* ATCC 50983]
[gi|159898801](#) hypothetical protein Haur_2280 [*Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785]
[gi|21220960](#) transport ATPase [*Streptomyces coelicolor* A3(2)]
[gi|338782050](#) arginyl-tRNA synthetase [*Achromobacter xylosoxidans* AXX-A]
[gi|118588062](#) transcriptional regulator [*Stappia aggregata* IAM 12614]
[gi|307596174](#) hypothetical protein Vdis_2070 [*Vulcanisaeta distributa* DSM 14429]
[gi|260428060](#) sensory box sensor histidine kinase/response regulator [*Citricella* sp. SE45]
[gi|254381629](#) luxR family two-component response regulator [*Streptomyces* sp. Ng1]
[gi|312111862](#) 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit [*Geobacillus* sp. Y4.1MC1]
[gi|159899479](#) PASTA sensor-containing serine/threonine protein kinase [*Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785]
[gi|191779858](#) hypothetical protein Bxe_B0227 [*Burkholderia xenovorans* LB400]
[gi|194310895](#) gamma-glutamyltransferase 1 [*Cupriavidus metallidurans* CH34]
[gi|71003998](#) hypothetical protein UM00518.1 [*Ustilago maydis* 521]
[gi|77533311](#) zinc finger family protein, putative, expressed [*Oryza sativa* Japonica Group]
[gi|66807347](#) LSM domain-containing protein [*Dictyostelium discoideum* AX4]
[gi|239608434](#) conserved hypothetical protein [*Ajellomyces dermatitidis* ER-3]
[gi|154243787](#) TetR family transcriptional regulator [*Xanthobacter autotrophicus* Py2]
[gi|195112971](#) GI22194 [*Drosophila mojavensis*]

[gi|77458903](#) Mass: 50139 Score: 167 Expect: 3.3e-10 Matches: 4

epralysin [*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Ions	Peptide
1460.6465	1459.6392	1459.6328	0.0064	276	- 289	0	40	R.TGDTTYGFNSNAGR.D
2021.9817	2020.9744	2020.9775	-0.0031	247	- 266	0	---	K.GGVEAYSSGPLMDDIAAIQK.L
2037.9744	2036.9671	2036.9725	-0.0053	247	- 266	0	---	K.GGVEAYSSGPLMDDIAAIQK.L + Oxidation (M)
2373.2468	2372.2395	2372.2448	-0.0053	43	- 65	0	112	R.GGNLTVNGKPSFVSDQAATQLLR.D

Figura 4.4 - Identificación por mapeo de huella peptídica (MALDI-ToF-Ms/Ms). Se muestra el resumen del listado obtenido mediante el análisis por MALDI-TOF con el motor de búsqueda MASCOT. Se muestran los primeros 20 hits del análisis y una lista de los péptidos que coinciden con la primera proteína, según la información proporcionada por UByPA.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO DE *Flavobacterium* sp. AU13

La segunda parte del trabajo de la tesina estuvo focalizado en una caracterización parcial del preparado enzimático por el estudio de diferentes propiedades bioquímicas.

4.2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El estudio de la actividad proteolítica a diferentes temperaturas (Fig. 4.6) sugiere que el preparado enzimático secretado por AU13 presenta un valor máximo de actividad a 40 °C. En el rango de temperatura de 25 a 35 °C se observó valores de actividad relativa superiores al 60 %. A temperaturas apenas mayores a 40 °C, la actividad del preparado decayó abruptamente llegando a ser nula a los 60 °C (temperatura óptima de muchas enzimas mesófilas). Por lo tanto, el preparado presentó un perfil de actividad respecto a la temperatura característico de las enzimas siccófilas. Para los ensayos de actividad posteriores la temperatura se fijó a 40 °C.

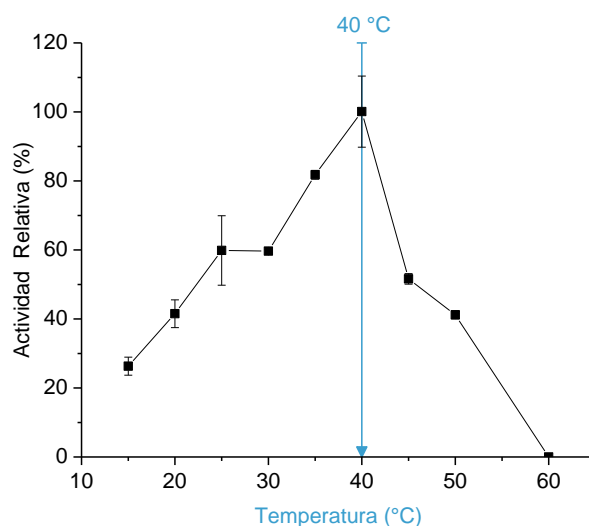


Figura 4.6 – Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del preparado enzimático

Los ensayos se realizaron a pH 6,0. Se graficaron los valores de actividad relativa (%) en función de la temperatura, tomando como 100 % la actividad máxima registrada. La desviación estándar de cada medición independiente se representa con barras verticales. En algunos casos, la desviación tiene un tamaño menor que el símbolo.

4.2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA

Se analizó la estabilidad del preparado enzimático luego de ser incubado a temperaturas fijas por diferentes tiempos. Se realizaron dos ensayos a pH 6, uno a 25 °C y otro a 40 °C (Fig. 4.7). Estos resultados indicaron que, a las temperaturas estudiadas, el preparado enzimático mantuvo un porcentaje de actividad remanente superior a 80 % luego de incubarse cinco horas a las dos temperaturas estudiadas. A 25 °C, luego de una pérdida del 10 % de la actividad inicial a los 10 min de incubación, el preparado mantuvo una actividad residual en el entorno del 90%. Adicionalmente, a 40 °C, en los primeros 10 min de incubación se observó el mismo comportamiento que a 25 °C, que fue recuperado en los siguientes 50 min (sugiriendo una pérdida de actividad reversible) y luego un período (1 a 5 hs) en el que la actividad residual se mantuvo en el entorno del 80%.

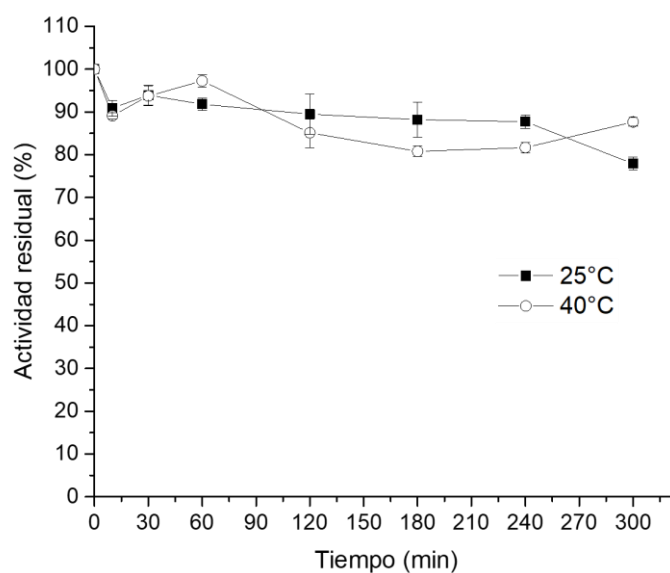


Figura 4.7 – Estabilidad térmica del preparado enzimático estudiada a 25 °C y 40 °C. Los resultados se expresaron como la actividad residual (%), tomando como 100 % la actividad a tiempo cero.

4.2.3. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se estudió el efecto del pH en la actividad enzimática, a la temperatura en el que el preparado manifiesta la mayor actividad (40 °C). Los resultados se muestran en la Figura 4.8. Como se puede apreciar, en las condiciones del ensayo, el preparado enzimático producido por AU13 es activo en un amplio rango de pH (entre 5 y 9) con un máximo a pH 6. El menor valor de actividad en el rango de pH ensayado se obtuvo a pH 8, siendo el 60% del valor obtenido en el ensayo a pH 6. Igualmente, las diferencias de actividad no fueron significativas entre 7, 8 y 9.

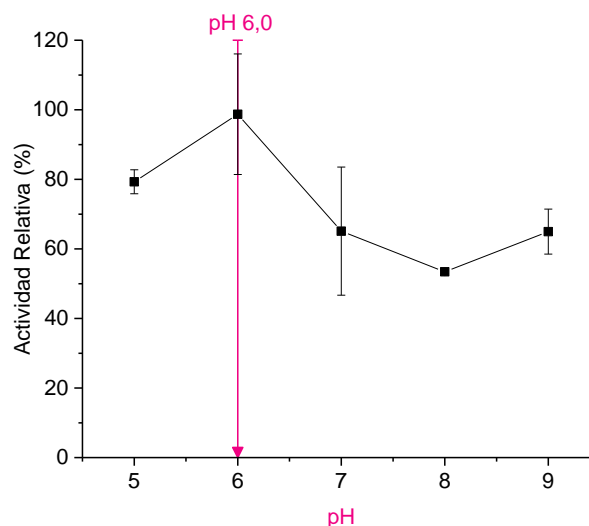


Figura 4.8 – Efecto del pH en la actividad proteolítica, a 40 °C. Se graficaron los valores de actividad relativa (%) en función de pH tomando como 100 % la actividad máxima registrada.

4.2.4. EFECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se determinó el efecto de algunos inhibidores específicos para las diferentes familias de proteasas, sobre la actividad del extracto libre de células, a 40 °C y pH 6. Los datos se expresaron como actividad residual, respecto a la actividad del preparado enzimático sin el agregado del inhibidor (Figura 4.9). No se detectó inhibición del preparado por el agregado de PMSF, iodoacetamida o pepstatina, sugiriendo que la actividad proteolítica del preparado no correspondería a la presencia de proteasas serínicas, cisteínicas, ni aspárticas. Por el contrario, cuando la muestra se trató con EDTA se produjo una inhibición de la actividad proteolítica del 83 % sugiriendo que el preparado contendría al menos una metaloproteasa, coincidiendo con su potencial identificación como una epralisina.

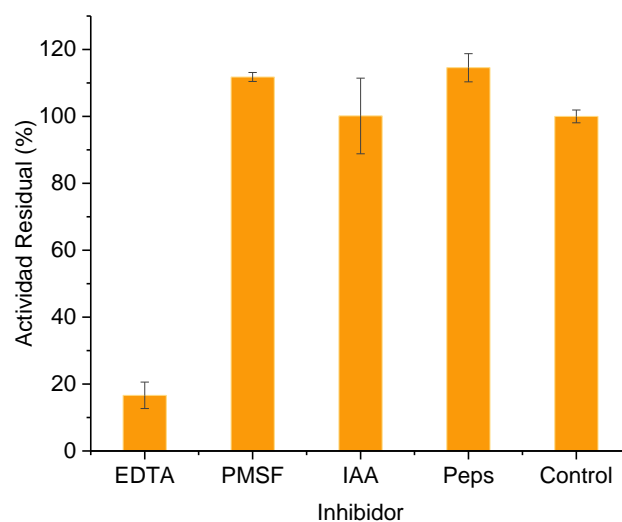


Figura 4.9 – Efecto de los inhibidores de los diferentes tipos catalíticos de proteasas, sobre el preparado enzimático producido por AU13. Los resultados se expresaron como la actividad residual (%), tomando como 100 % la actividad del control sin inhibidor. Los inhibidores utilizados fueron: Ac. Etilendiaminotetracético (EDTA), Fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), Iodoacetamida (IAA) y Pepstatina.

4.3. EVALUACIÓN DE USOS BIOTECNOLÓGICOS

Se evaluó el potencial uso biotecnológico de las enzimas presentes en el preparado como aditivo en detergentes de ropa en condiciones normales de un lavado. Se estudio la actividad y la estabilidad de estas enzimas frente a agentes surfactantes, oxidantes y detergentes comerciales.

4.3.1. EFECTO DE AGENTES SURFACTANTES Y OXIDANTES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se analizó el efecto de surfactantes y oxidantes comúnmente utilizados en el laboratorio sobre la actividad del preparado enzimático en estudio. Los agentes surfactantes y oxidantes están presentes en los detergentes de ropa comerciales, por lo que es fundamental analizar cómo éstos afectan a la actividad enzimática del preparado enzimático en estudio. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Figura 4.10.

La acción de los distintos surfactantes estudiados parece tener un efecto activador de la actividad proteolítica (Fig. 4.10 a). Este incremento fue más notorio cuando el preparado enzimático se incubó con una solución al 20% de estos agentes respecto a la solución al 7%.

Incluso, al evaluar el efecto de los surfactantes al 20% de concentración (la concentración más alta ensayada) se observó un aumento de la actividad. La solución de Tritón x100 al 20% fue en la que se observó el mayor efecto activador, alcanzando un valor de actividad del preparado enzimático de más del doble respecto a la muestra en ausencia de agentes surfactantes.

El efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad proteolítica de AU13 mostró comportamientos diferentes, dependiendo de la concentración del oxidante. A concentraciones entre 3 y 10 % se observó un aumento de la actividad del 57,6 y 39,5 % respectivamente, respecto a la muestra sin agente oxidante. Sin embargo, a concentraciones más altas del agente oxidante (entre 20 y 50 %), se observó una clara disminución de la actividad de 56,8 y 79,48 % respecto a la enzima sin agente oxidante.

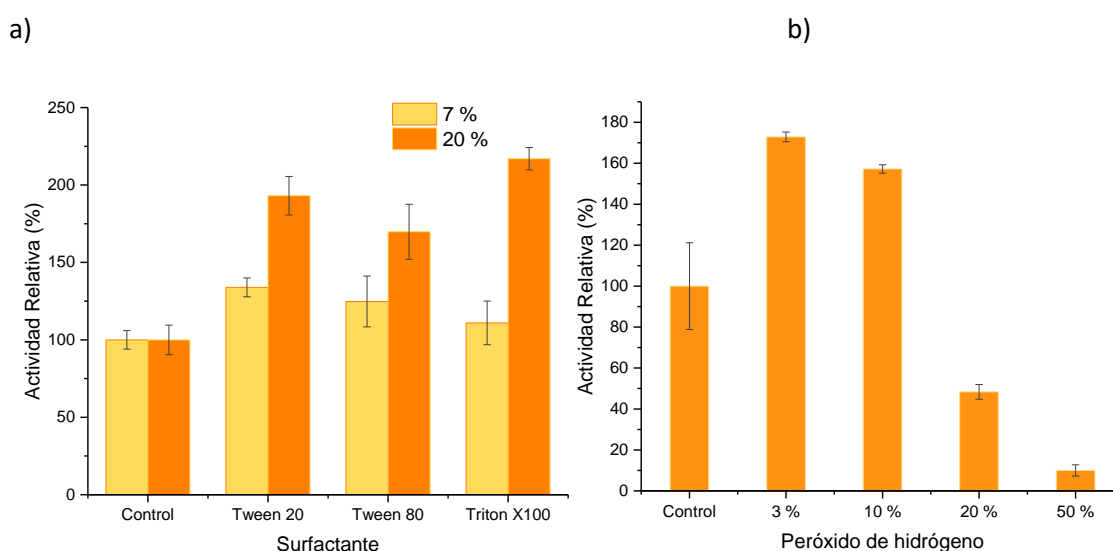


Figura 4.10 – Efecto de surfactantes y oxidantes en la actividad. Se ensayó la actividad a 40 °C por 30 min de las enzimas (0,05U) en presencia de **a)** diferentes detergentes de laboratorio a concentraciones del 7 y 20 %; **b)** H₂O₂ como agente oxidante a concentraciones del 3, 10, 20 y 50 %. Los resultados se expresan como la actividad relativa respecto al control sin surfactante u oxidante.

El análisis preliminar de los resultados sugiere que las enzimas presentes en el preparado tienen algunas características bioquímicas que las hacen aptas para su uso en procesos biotecnológicos relacionados al desarrollo de los detergentes (actividad frente a detergentes y oxidantes). Sin embargo, los detergentes comerciales podrían contar con otros agentes que interfieran con la actividad de las enzimas o afecten sus estructuras, impidiendo así que éstas puedan actuar bajo las condiciones de lavado convencional.

4.3.2. EFECTO DE DETERGENTES COMERCIALES EN LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS DEL PREPARADO.

Para evaluar el potencial uso de las enzimas como aditivo de detergentes, se determinó la actividad proteolítica del preparado enzimático en presencia de diferentes detergentes comerciales (Anexo VI), (cuyos agentes enzimáticos se inactivaron previamente). Se realizaron ensayos de actividad en presencia de los detergentes a tiempo 0 y a 1 hora.

Para los ensayos, se simularon las condiciones de tiempo, concentración de detergente y temperatura de un lavado a temperatura ambiente. Como se expone en la Figura 4.11 (a) en todos los casos testeados la actividad relativa del preparado enzimático mezclado con detergentes comerciales es superior a la actividad de la muestra en ausencia de detergente. Este incremento de la actividad proteolítica es superior al 50% en la mezcla del preparado enzimático con el detergente comercial Nevex Matic®. Luego de una hora de incubación 4.11 (b), se pudo observar que la actividad enzimática se ve afectada con alguno de los detergentes comerciales. La mezcla del preparado con el detergente Ariel®, parece afectar la estabilidad de la enzima de forma negativa, observándose una disminución de un 67 % de la actividad respecto al control. Con los demás detergentes, la estabilidad de la enzima no parece verse afectada, mostrando valores de actividad relativa comparables a los obtenidos a tiempo cero.

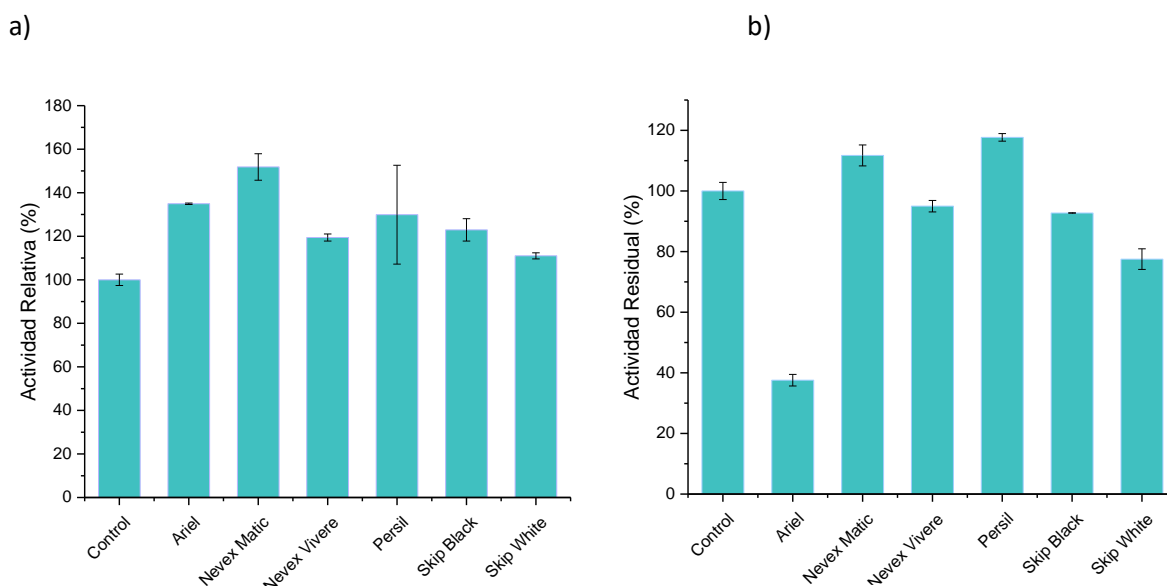


Figura 4.11 – Efecto de los detergentes comerciales en la actividad proteolítica del sobrenadante libre de cultivo. **a)** Se determinó la actividad del preparado enzimático (0,04 U) en presencia de diferentes detergentes comerciales a concentración final de 0,5%. Los resultados se expresan como actividad relativa (%) respecto al control sin detergente. **b)** Estabilidad de la actividad en presencia de detergentes. El preparado enzimático (0,04 U) se incubó con los diferentes detergentes durante 1 h a 25 °C y se determinó la actividad residual (%). Los resultados se expresan como porcentaje de actividad residual respecto al control sin detergente.

Según los resultados obtenidos, en función de un posible uso biotecnológico de las enzimas del preparado en la industria de los detergentes, éstas presentarías un adecuado comportamiento frente a detergentes comerciales y sus componentes adicionales. En primer lugar, se observó que el preparado enzimático incorporado a un detergente comercial aumentó su actividad

proteolítica para todos los detergentes testeados. En segundo lugar, los ensayos de estabilidad sugieren que la actividad del preparado enzimático se mantiene estable frente a la mayoría de los detergentes comerciales ensayados. Estas características son deseables en enzimas con posibles usos en la industria de los detergentes.

5. DISCUSIÓN

Debido a sus bajas temperaturas, la Antártida es una gran fuente de organismos psicrófilos y psicrotolerantes, los cuales han desarrollado adaptaciones particulares para sobrevivir a las bajas temperaturas. Entre estas adaptaciones está la producción de enzimas psicrófilas.

En esta tesis, se trabajó con la cepa aislada por Martínez-Rosales & Castro-Sowinski (2011), identificada como *Flavobacterium* sp., aislamiento AU13, la cual es una bacteria psicrotolerante productora de proteasas extracelulares, durante su crecimiento tanto a 4 °C como a 18 °C. Se comprobó que *Flavobacterium* sp. AU13 es capaz de producir agentes proteolíticos creciendo a 16 °C en medio líquido (temperatura dentro del rango evaluado por Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011, pero en medio agarizado) ³⁰.

Empleando las técnicas descritas en Materiales y Métodos, se trabajó para caracterizar este agente proteolítico. La presencia de actividad proteolítica en el medio libre de células confirmó que el microorganismo es capaz de producir proteasas y secretarla al medio extracelular. Existen reportes de otras especies de *Flavobacterium* productoras de proteasas extracelulares ³⁷⁻⁴⁰, aisladas de la Antártida ⁴¹. Para confirmar la identidad de la proteasa, sería necesario conocer su secuencia genómica e identificar la presencia de un péptido señal que confirme que es una proteína de secreción y que no se trata de una enzima proveniente de la lisis celular.

Los resultados obtenidos de la electroforesis y revelado específico (zimograma), indican que el extracto cuenta con al menos una proteína mayoritaria con actividad proteolítica y una posible proteína minoritaria de menor movilidad también activa. La presencia de más zonas del gel que parecieran presentar actividad proteolítica puede deberse a un artefacto del zimograma.

Mediante la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se obtuvo más información sobre la composición proteica del extracto extracelular o secretoma. Se observó una banda proteica mayoritaria de 48 kDa, siendo posiblemente la banda más abundante también en el zimograma (Fig. 4.2) y la que se sospechaba podría ser la peptidasa. Por tal motivo, esta banda se seleccionó para realizar los estudios de mapeo peptídico.

De acuerdo al análisis realizado por espectrometría de masa de los fragmentos obtenidos por digestión trípica de la banda de 48 kDa observada en el SDS-PAGE, se obtuvieron tres fragmentos con un alto porcentaje de coincidencia con la secuencia de una epralisina sintetizada por *Pseudomonas fluorescens*. Las epralisinas son metaloproteasas alcalinas que pertenecen a la familia M10 de metaloendopeptidasas, subfamilia M10B; siendo la serralisina (M10.051) la proteasa tipo. Este tipo de proteasas son proteínas extracelulares, que por lo

general tienen un rol nutricional o de degradación de proteínas de la matriz celular. En general, las epralisinas son capaces de hidrolizar azocaseína en un rango de pH entre 7-9 y entre 30 y 37 °C ⁴². Las epralisinas (M10.060) bacterianas reportadas hasta el momento son todas producidas por microorganismos del género *Pseudomonas*. Por otro lado, dentro de la subfamilia M10B también está incluida la metaloproteasa alcalina siccófila (M10.062), producida por varias especies del género *Pseudomonas* y por la cepa de *Flavobacterium* sp. YS-80-122 ⁴³, según la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>).

El mecanismo catalítico se determinó utilizando inhibidores para los diferentes tipos catalíticos de peptidasas. En comparación con el control libre de inhibidor, se observó que las enzimas presentes en el preparado serían metaloproteasas. De acuerdo a los resultados experimentales, la actividad del extracto no se vio inhibida al 100% debido a la presencia de otras proteasas minoritaria. Esto podría deberse a que la inhibición de proteasas metálicas puede ser dependiente del tiempo de inhibición y de la concentración de inhibidor en algunos casos ⁴⁴. Se trabajó con un solo tiempo de inhibición y una sola concentración por lo que sería necesario realizar nuevos ensayos considerando estas variables para poder ser más concluyentes respecto a la presencia o no de otras peptidasas con mecanismos catalíticos diferentes. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para la peptidasa en estudio por los análisis proteómicos, que mostraron que la peptidasa de 48 kDa sería una epralisina, perteneciente a la subfamilia M10B de metalopeptidasas. Esta enzima, aunque es sintetizada casi exclusivamente por aislamientos de *Pseudomonas*, podría guardar similitud con las enzimas en estudio.

Otros autores han reportado la producción de metaloproteasas psicrófilas en cepas del género *Flavobacterium*, como es el caso de *Flavobacterium psychrophilum* y *Flavobacterium balustinum* P104 ^{37,45}.

Según los resultados obtenidos del estudio del efecto de la temperatura en la actividad, se pudo observar que el preparado enzimático presentó un óptimo de actividad a 40 °C y una pérdida completa de la actividad a 60°C. Esta característica bioquímica es un claro indicativo de que las enzimas presentes en el preparado podrían ser enzimas psicrófilas. Para afirmar esta hipótesis, se deberían estudiar características de la proteína a nivel de secuencia y estructura, como puede ser la presencia de residuos aminoacídicos que le otorguen flexibilidad, o una comparación estructural mediante difracción de rayos X con proteínas homólogas mesófilas. En comparación con otras proteasas psicrófilas producidas por bacterias del género *Flavobacterium*, el perfil de actividad en función de la temperatura es muy similar. Tanto la proteasa producida por *F. balustinum* ³⁷, como la producida por *F. psychrophilum* ⁴⁵, presentan una temperatura óptima de actividad a 40 °C, perdiendo casi completamente la actividad a 60 °C.

Además, se evaluó la estabilidad de las enzimas a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad del preparado enzimático se mantiene estable a 25 y 40 °C aún luego de cinco horas de incubación. Este comportamiento podría deberse a que no es una enzima purificada sino un extracto enzimático. Otros componentes del extracto podrían tener un efecto estabilizador de la actividad enzimática. En comparación con las proteasas previamente mencionadas, estas son menos estables perdiendo actividad en períodos de

tiempo aún más cortos. La proteasa producida por *F. balustinum* anteriormente mencionada, luego de pasar por un proceso de purificación, pierde el 40% de actividad luego de ser incubada por una hora a 40 °C, quedando totalmente inactiva luego de una hora de incubación a 50 °C³⁷. Esta diferencia puede verse influida por el paso previo de purificación por el que pasó la proteasa producida por *F. balustinum*. La proteasa producida por *F. psychrophilum* pierde el 100% de su actividad luego de incubarse durante 5 min a 40 °C, libre de metales. Sin embargo, al adicionarle CaCl₂ (5 mM), el preparado pierde totalmente la actividad luego de ser incubado por una hora a 40 °C⁴⁵.

Desde el punto de vista biotecnológico, las enzimas psicrófilas podrían presentar características deseables en comparación con sus homólogas mesófilas. En algunos procesos industriales, por ejemplo, se podrían utilizar en detergentes de ropa, siendo más eficientes a temperaturas normales de lavado, resultando en un ahorro de energía y haciendo el proceso más amigable con el medio ambiente. Actualmente, existen detergentes de ropa que utilizan proteasas como aditivo para mejorar la remoción de manchas⁴⁶. Se encuentran además, detergentes de ropa que utilizan proteasas psicrófilas cuya acción de remoción de manchas es más efectiva a bajas temperaturas, en comparación a detergentes que no cuentan con este tipo de proteasas⁴⁷.

El estudio del efecto del pH en la actividad proteolítica determinó que, en las condiciones del trabajo, la actividad sería máxima a pH 6. Igualmente, no se observaron disminuciones de la actividad muy marcadas en el rango de pH estudiado. Al comparar estos datos con los datos de las proteasas producidas por *F. balustinum* y *F. psychrophilum*^{37,45} (pH óptimo de actividad de 8 a 30 °C y 6,5 a 37 °C, respectivamente), se encuentra que el preparado enzimático de este trabajo tendría características bioquímicas más similares a la proteasa de *F. psychrophilum* en comparación a la producida por *F. balustinum*.

La robustez de la actividad del preparado enzimático a las variaciones del pH sería una característica deseable en una enzima con potencial uso biotecnológico en la industria de los detergentes, ya que no se vería significativamente inactivada al pH en el que se realiza un lavado de ropa convencional. Es deseable que el pH óptimo de la proteasa sea cercano al de una solución de detergente¹¹. Aunque el preparado enzimático presentó un pH óptimo de 6, su actividad fue muy buena a valores de pH alcalinos (la actividad relativa se mantuvo superior al 50% en el rango de pH evaluado). Dado que el pH de los detergentes para ropa es alcalino, las proteasas y otras enzimas que se usan actualmente en estos detergentes deben presentar buena actividad a pHs alcalinos⁴⁸.

Como último aspecto, se evaluó un posible uso biotecnológico del preparado enzimático. Concretamente nos enfocamos en evaluar la compatibilidad del preparado enzimático con los componentes comunes de los detergentes comerciales (tensoactivos y blanqueadores). Estos ensayos son fundamentales para seleccionar proteasas como posibles aditivos de detergentes para la ropa^{49,50}.

Para ello, se evaluó la actividad del preparado enzimático en presencia de tensoactivos de uso común en el laboratorio. Los resultados mostraron un aumento de la actividad proteolítica en presencia de los diferentes agentes tensoactivos ensayados. Una hipótesis que explicaría este resultado sería que el detergente forme un área interfacial que favorezca el desempeño enzimático. Este mismo comportamiento se reportó para proteasas de origen vegetal en

trabajos similares ^{18,51,52}. Al entrar en contacto la enzima con una interfase, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica se modifica y se potencian las interacciones electrostáticas. Se cree que esto produce un reordenamiento y reorientación más favorable de los residuos catalíticos ⁵³. Este fenómeno se podría confirmar realizando ensayos de actividad proteolítica que utilicen sustratos sintéticos, para reafirmar que el efecto del detergente es sobre las enzimas y no sobre el sustrato. Para determinar que este efecto se esté dando en la enzima y no en el sustrato, se deberían realizar estos mismos estudios utilizando sustratos sintéticos que no se vean afectados por la presencia de surfactantes.

También se evaluó la actividad del preparado enzimático en presencia de agentes oxidantes (habitualmente utilizados como agentes blanqueadores en detergentes comerciales). A bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (3 y 10%), se observó un aumento de la actividad proteolítica, siendo mayor a la menor concentración del agente oxidante ensayado. Concentraciones de oxidante más altas, como 20 y 50 %, se produjo una disminución de la actividad proteolítica, con respecto al control sin oxidante. Existen otros reportes de proteasas cuya actividad se incrementó en presencia de un oxidante; por ejemplo, la actividad de una proteasa sintetizada por *Streptomyces olivochromogenes* también aumentó en presencia de este agente ⁵⁴. Esta acción activadora a bajas concentraciones de agente oxidante podría explicarse debido a que el agente oxidante es capaz de hidrolizar la azocaseína, haciendo que las enzimas actúen sobre fragmentos más pequeños y a mayor velocidad. Por lo tanto, el aumento de agente oxidante podría resultar en un aumento de la actividad hasta cierto límite en el que en exceso de este agente, podría alterar la estructura de las enzimas ⁵⁴.

Como último aspecto de la potencialidad de uso biotecnológico de estas enzimas, se evaluó la actividad del preparado enzimático en presencia de detergentes comerciales de lavandería de diversas marcas. Estas condiciones serían representativas de las condiciones bajo las cuales debería actuar el preparado enzimático, en un lavado de ropa. Al igual que en el ensayo con detergentes de laboratorio, en todos los casos evaluados, el preparado enzimático presentó un aumento de su actividad al ser expuesto a detergentes comerciales. Una vez comprobado que el preparado enzimático era activo en detergentes comerciales, fue necesario verificar si las enzimas eran estables en el tiempo que dura un lavado a temperatura ambiente. En este caso, solamente el detergente comercial Ariel afectó la estabilidad del preparado enzimático. Los ensayos con los otros detergentes comerciales, mostraron un efecto potenciador de la actividad, que se mantuvo a lo largo del tiempo (1 hora). Este efecto fue observado en otras proteasas, como la enzima Pura Felt 4000 (Genecor International Argentina S.R.L), la cual también presentó un aumento en la actividad residual luego de ser incubada durante una hora a 25 °C con detergentes comerciales¹⁷. Sin embargo, una proteasa de origen vegetal extraída de *Bromelia antiacantha* presentó una marcada disminución de la actividad residual en las mismas condiciones de ensayo ¹⁷. En este aspecto, los resultados obtenidos son prometedores debido a que, bajo las condiciones del ensayo, el preparado enzimático estudiado en este trabajo presenta un comportamiento similar a una enzima comercial utilizada en la industria de los detergentes.

6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se estudió un preparado enzimático producido por el microorganismo antártico *Flavobacterium sp.* AU13. La proteasa mayoritaria del mismo se identificó como una metalo-proteasa extracelular de aproximadamente 48 kDa, con una temperatura óptima de 40 °C (enzima psicrófila) y activa en un amplio rango de pH (de 5 a 9).

La evaluación como aditivo biotecnológico en la industria de los detergentes, el preparado enzimático en estudio no solo es compatible con los principales componentes presentes en los detergentes, sino que su actividad proteolítica se ve incrementada. Las enzimas se mantienen estables en el tiempo y temperatura de un lavado de ropa convencional a temperatura ambiente.

Las enzimas presentes en el preparado enzimático producido por *Flavobacterium sp.* AU13 son interesantes candidatas para su aplicación industrial como aditivo de detergentes.

Perspectivas:

Mejorar la caracterización de las bandas minoritarias identificadas por electroforesis y presentes en el secretoma. En particular, identificar la banda activa de menor movilidad respecto a la banda de la proteasa mayoritaria. Sería conveniente realizar un zimograma con inhibidores de proteasas y determinar su mecanismo catalítico.

Además, sería conveniente ampliar los parámetros de los ensayos realizados incluyendo otros pH, otras temperaturas y mayores tiempos en los ensayos de inhibidores y estabilidad.

Purificar las proteínas del extracto libre de células, usando diferentes métodos de purificación proteica. Se evaluarán diferentes tipos de cromatografías.

Realizar la secuenciación del genoma de *Flavobacterium sp.* AU13 y la posterior identificación de los genes que codifican las enzimas en estudio. De ser necesario, esto permitiría producir estas enzimas de forma recombinante, y su caracterización.

Se realizarán los correspondientes ensayos de cinética enzimática, calcular la velocidad de las enzimas a diferentes temperaturas y determinar su efectividad a bajas temperaturas.

Por último, podría ser relevante explorar otros potenciales sustratos que deriven en usos industriales diversos. Una perspectiva del grupo de trabajo será evaluar el potencial de las enzimas presentes en el preparado para producir péptidos bioactivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and & Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597–635 (1998).
2. Beynon, R. & Bond, J. *Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach (Second Edition)*. *Biochemical Education* **18**, (2001).
3. McDonald, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem. J.* **17**, 773–785 (1985).
4. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632 (2018).
5. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4523 (2002).
6. Erez, E., Fass, D. & Bibi, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**, 371–378 (2009).
7. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. *Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases*. *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2**, (2013).
8. E. Labrou, N. Clostripain. *Handb. Proteolytic Enzym.* **2**, 2323–2327 (2013).
9. van den Burg, B. & Eijsink, V. Thermolysin and related Bacillus metallopeptidases. *Handb. Proteolytic Enzym. Second Ed.* **1**, 374–387 (2004).
10. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. *Introduction: metallopeptidases and their clans*. *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition* **1**, (2004).
11. Gupta, R., Beg, Q. & Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 15–32 (2002).
12. Infante, I. *et al.* Wool-degrading Bacillus isolates: Extracellular protease production for microbial processing of fabrics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1047–1052 (2010).
13. da Silva, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **183**, (2017).
14. Guevara, M. G. & Daleo, G. R. *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes* (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-97132-2
15. Jäkälä, P. & Vapaatalo, H. Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals* **3**, 251–272 (2010).
16. Kirk, O., Borchert, T. V. & Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345–351 (2002).
17. Bersi, G., Vallés, D., Penna, F., Cantera, A. M. & Barberis, S. Valorization of fruit by-products of Bromelia antiacantha Bertol.: Protease obtaining and its potential as additive for laundry detergents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **18**, (2019).
18. Barberis, S., Quiroga, E., Barcia, C. & Liggieri, C. Effect of laundry detergent formulation on the performance of alkaline phytoproteases. *Electron. J. Biotechnol.* **16**, 1–8 (2013).

19. Ron, E. Z. Growth rate of Enterobacteriaceae at elevated temperatures: limitation by methionine. *J. Bacteriol.* **124**, 243–246 (1975).
20. Nazina, T. N. *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus th.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 433–446 (2001).
21. Irgens, R. L., Gosink, J. J. & Staley, J. T. Marine , Gas Vacuolate Bacterium from Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 822–826 (1996).
22. Blöchl, E. *et al.* *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**, 14–21 (1997).
23. Morita, R. Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews* **39**, 144–167 (1975).
24. Collins, T. & Margesin, R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2857–2871 (2019).
25. Feller, G. & Gerday, C. Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 200–208 (2003).
26. Russell, R. J. M., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. & Taylor, G. L. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure* **6**, 351–361 (1998).
27. Białkowska, A. M., Morawski, K. & Florczak, T. Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 1325–1342 (2017).
28. Martínez-Rosales, C., Fullana, N., Musto, H. & Castro-Sowinski, S. Antarctic DNA moving forward: Genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Letters* **331**, 1–9 (2012).
29. Marx, J. C., Collins, T., D’Amico, S., Feller, G. & Gerday, C. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Marine Biotechnology* **9**, 293–304 (2007).
30. Martínez-Rosales, C. & Castro-Sowinski, S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res.* **30**, (2011).
31. Fullana, N. *et al.* Identification, recombinant production and partial biochemical characterization of an extracellular cold-active serine-metalloprotease from an Antarctic *Pseudomonas* isolate. *AIMS Bioeng.* **4**, 386–401 (2017).
32. Villadóniga, C., Macció, L. & Cantera, A. M. B. Acid whey proteolysis to produce angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolyzate. *Environ. Sustain.* **1**, 267–278 (2018).
33. Andrews, B. A. & Asenjo, J. A. Synthesis and regulation of extracellular beta (1-3) glucanase and protease by *Cytophaga* sp. In batch and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1366–1375 (1986).
34. Kruger, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. in 17–24 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009). doi:10.1007/978-1-59745-198-7_4
35. Ellis, K. J. & Morrison, J. F. Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-

- Dependent Processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405–426 (1982).
36. Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. Types and families of endopeptidases. in *Biochemical Society Transactions* **19**, 707–715 (1991).
 37. Morita, Y. *et al.* Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 669–675 (1998).
 38. Newton, J. C., Wood, T. M. & Marlenehartley, M. Isolation and partial characterization of extracellular proteases produced by isolates of *flavobacterium columnare* derived from channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* **9**, 75–85 (1997).
 39. Ostland, V. E., Byrne, P. J., Hoover, G. & Ferguson, H. W. Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* **23**, 329–336 (2000).
 40. Boguslawski, G., Shultz, J. L. & Yehle, C. O. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Anal. Biochem.* **132**, 41–49 (1983).
 41. Tropeano, M., Vázquez, S., Coria, S. & Turjanski, A. Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic The enzymes produced by microorganisms living in extreme environments are. *Polish polar resaearch* **34**, 1–15 (2013).
 42. Takahashi, K. Epralysin. *Handb. Proteolytic Enzym.* 875–877 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00183-6
 43. Wang, F., Hao, J., Yang, C. & Sun, M. Cloning, expression, and identification of a novel extracellular cold-adapted alkaline protease gene of the marine bacterium strain YS-80-122. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 1497–1505 (2010).
 44. Alud, D. S. Removal and Replacement of Metal Ions in Metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**, 235–236 (1995).
 45. Secades, P., Alvarez, B. & Guijarro, J. A. Purification and Characterization of a Psychrophilic, Calcium-Induced, Growth-Phase-Dependent Metalloprotease from the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2436–2444 (2001).
 46. Maurer, K. H. Patent No. 569295, Detergent compositions. (1987).
 47. Beck, C. & Strobel, R. Patent No. WO 88/03948, Low-temperature active alkaline protease from *Paecilomyces marquandii* and its pretaration. 33 (1988).
 48. Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W. & Soni, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* **35**, 213–219 (1999).
 49. Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R. K. & Khan, S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **21**, 135–138 (1999).
 50. Kumar, C. G. & Takagi, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **17**, 561–594 (1999).
 51. Morcelle, S. R., Barberis, S., Priolo, N., Caffini, N. O. & Clapés, P. Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funarium clausum* as catalysts for

- the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **41**, 117–124 (2006).
52. Quiroga, E., Priolo, N., Obregón, D., Marchese, J. & Barberis, S. Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits. *Biochem. Eng. J.* **39**, 115–120 (2008).
 53. González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. & del Monte Martínez, A. Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **12**, 113–140 (2010).
 54. Simkhada, J. R. *et al.* An oxidant- and organic solvent-resistant alkaline metalloprotease from *Streptomyces olivochromogenes*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 1457–1470 (2010).

ANEXOS

ANEXO I - MEDIOS DE CULTIVO

Medio Luria – Bertani (LB)

Triptona	10g/l
Extracto de Levadura	5g/l
NaCl	10g/l

Medio Luria – Bertani – Leche (LBL)

Mezclar en partes iguales:

- Medio LB (1/10)
- Leche 10%

(La leche debe ser autoclavada por separado y por un tiempo no mayor a 10 min. También puede ser esterilizada por otros métodos)

ANEXO II - SOLUCIONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Solución colorante (Azul de Coomassie)

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,2% (p/v)
Etanol	30% (v/v)
Ácido Acético	7% (v/v)

Solución decolorante

Etanol	30% (v/v)
Ácido acético	7% (v/v)

Gel Concentrador 4%

30% Acrilamida	0,99ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1,89ml
10% SDS	75µl
Agua Destilada	4,5ml
TEMED	7,5µl
10% APS	37,5µl

Gel Separador 7,5%

30% Acrilamida	3,75ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3,75ml
10% SDS	150µl
Agua Destilada	7,28ml
TEMED	7,5µl
10% APS	75µl

Gel Separador 12%

30% Acrilamida	6ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3,75ml
10% SDS	150µl
Agua Destilada	5,03ml
TEMED	7,5µl
10% APS	75µl

ANEXO III – BUFFER, SOLUCIONES Y REACTIVOS

Buffer de Actividad (0,2M, pH6)

Fosfato de Sodio monobásico 0,2M	16ml
Fosfato de Sodio dibásico 0,2M	84ml

Buffer de muestra SDS-PAGE 4X

Tris Base	2g
Glicerol	20 mL
Azul Bromofenol	1 mg
SDS	2 mL
β-mercaptoetanol	2mL
Agua Destilada	csp 50 mL
Ajustar a pH 6,8 con HCl	

Buffer de muestra Native-PAGE 2X

Buffer Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	3,75ml
Glicerol 50%	24ml
Azul Bromofenol 1%	0,3ml
Agua Destilada	csp 30ml

Buffer Ellis (0,2M, ajustado en el rango de pH 5 – 9)

Ácido acético	0,1 mol
MES	0,1 mol
Trizma base	0,2 mol
H ₂ O Milli Ro	csp 1L

Reactivo de Bradford

Azul de Coomasie G	100 mg
Etanol	50 mL
Ácido fosfórico 85% (p/v)	100 mL
Agua csp	1000 mL

Marcadores de peso molecular

- MW1

Numero de catálogo	Proteína	Peso molecular (kDa)
A7517	Seroalbúmina Bovina	66
A7042	Ovoalbúmina Bovina	45
T9011	Tripsinógeno	24
T9128	Inhibidor de la tripsina de <i>Glycine max</i> (soja)	20,1
L6385	Alfa-lactoalbúmina	14,2

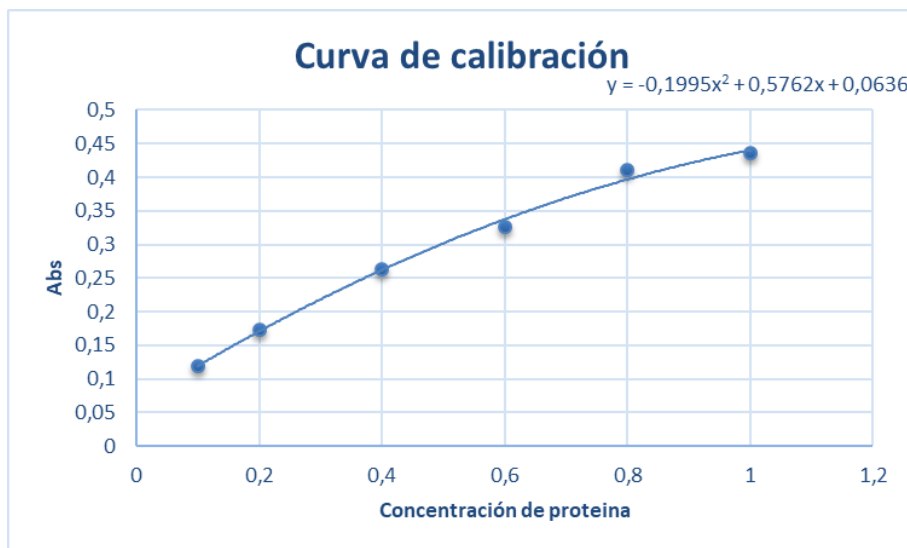
- MW2

Numero de catálogo	Proteína	Peso molecular (kDa)
A7517	Seroalbúmina Bovina	66
L6385	Alfa-lactoalbúmina	14,2

- MW3

Numero de catálogo	Proteína	Peso molecular (kDa)
A7042	Ovoalbúmina Bovina	45
T9011	Tripsinógeno	24
T9128	Inhibidor de la tripsina de <i>Glycine max</i> (soja)	20,1

ANEXO IV – CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD CON BSA



ANEXO V – INHIBIDORES DE PROTEASAS

	EDTA	IIA	PMSF	PEPS
	Ac. etilendiaminotetracético	Iodacetamida	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo	Pepstatina
Proteasas blanco	Proteasas metálicas proteasas activadas por metales	Proteasas cisteínicas	Proteasas serínicas	Algunas proteasas aspárticas
Peso molecular	372,24 (sal disódica dihidratada)	184,9	174,2	685,9
Concentración efectiva	1-10 mM.	10-100 µM (preparar antes de usar)	0,1-1 mM (vida media 1 h a pH 7,5)	1 µM (estable por un día)
Solución stock	0,5 M en agua, pH 8,5.	10-100 mM en agua (preparar antes de usar)	200 mM en solventes secos (metanol, etanol)	1 mM en metanol o DMSO (estable por meses a -20°C)
Mecanismo de acción	Actúa como quelante del ion zinc del sitio activo de las proteasas metálicas, pero puede también inhibir otras proteasas dependientes de iones metálicos tales como las proteasas cisteínicas dependientes de calcio.	No es específico para el residuo de cisteína del sitio activo de las proteasas cisteínicas y puede inhibir muchas otras enzimas. También reacciona con tioles de bajo peso molecular como β-mercaptoetanol.	También inhibe proteasas cisteínicas	Análogo de estado de transición que es un inhibidor potente de cathepsina D, pepsina, renina y muchas proteasas aspárticas microbianas.

ANEXO VI – DETERGENTES COMERCIALES

Marca	Componentes
Skip Black	Alquil aril sulfonato de sodio, jabón de sodio, ablandador de agua, agentes anti redepositantes, aditivos de proceso, perfume y coadyuvantes
Skip White	Alquil aril sulfonato de sodio, jabón de sodio, ablandador de agua, catalizadores biológicos, blanqueador óptico, realzador de blancura, agentes anti redepositantes, aditivos de proceso, perfume y coadyuvantes
Ariel liquido concentrado	Alquil sulfato de sodio etoxilado, alquil benceno sulfonato de sodio lineal, alcohol etoxilado (tensioactivo no iónico), estabilizante, coadyuvante, quelante, enzimas, conservante, colorante, fragancia y agua.
Nevox liquido	Lineal alquil benceno sulfonato de sodio, alquil éter sulfonato de sodio (tensoactivos aniónicos), alcohol graso polietoxilado (tensioactivo no iónico), coadyuvantes, agentes reguladores de viscosidad y pH, neutralizante, blanqueador óptico, perfume, catalizadores biológicos, preservantes, colorante y agua.
Persil liquido	Propilenglicol, agua, abrillantador óptico y colorante. Químicos: Acido dodecilsulfónico (1-5%), Lauril éter sulfonato de sodio (5-15%). Enzimas (0.1-0.5%)