

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS TERMOFILAS PRODUCTORAS
DE PROTEASAS PROVENIENTES DE LOS GEISERES DE CALIENTES,
CANDARAVE. TACNA - PERÚ”**

TESIS

Presentada por:

Bach. ANA JULISSA NAQUICHE CALERO

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 244

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico y Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad N° 7998-2014-FACI-UN/JBG ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS TERMOFILAS PRODUCTORAS DE PROTEASAS PROVENIENTES DE LOS GEISERES DE CALIENTES, CANDARAVE. TACNA-PERÚ”** el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE: Dr. SEGUNDO MANUEL ALVARADO CONTRERAS.

SECRETARIO: Dr. CESAR AUGUSTO CEVALLOS COLUMBUS.

VOCAL: Msc. ISABEL ANCCO OLIVA.

Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público del día 29 de Diciembre del 2014 a la 10:15 horas.

Presentado por la Bachiller: **ANA JULISSA NAQUICHE CALERO**, de la Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

APROBADO por **UNANIMIDAD** con 3 votos a favor con calificación de **BUENO** con promedio de **16/20**.

Para ratificar lo detallado firman:



Dr. Segundo Manuel Alvarado
Contreras
PRESIDENTE



Dr. Cesar Augusto Cevallos
Columbus
SECRETARIO



Msc. Isabel Ancco Oliva
VOCAL

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial por mostrarme su amor día a día, guiándome en cada paso brindándome su fortaleza y bendiciones en los momentos más difíciles.

A mi madre, la mujer que más admiro, por sus cuidados, paciencia, fortaleza y coraje para salir adelante.

A mi querido esposo, Edsel, por tu apoyo incondicional y gran ayuda para lograr mis objetivos y por ser mi compañero y mi ángel protector.

A mi querida suegra por su gran apoyo, cariño, comprensión y paciencia

A mis queridos hermanos por ser mi inspiración para cumplir mis metas.

Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida.

A mi asesor el Dr. Roberto Castellanos Cabrera, por su apoyo, valiosa asesoría y consejos brindados en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Daladier Castillo, por su tiempo brindado, paciencia, dedicación y su valiosa asesoría.

Unas vez más a mi madre, hermanos, esposo, a la señora Carlota por su gran apoyo en todo momento. A mis amigos del Grupo de Investigación de Biotecnología de Extremófilos (GIBEX) que me apoyaron en lograr mis objetivos.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1 Planteamiento del Problema..... | 6 |
| 1.2 Hipótesis..... | 6 |
| 1.3 Justificación..... | 7 |
| 1.4 Objetivos..... | 9 |
| 1.4.1 Objetivo General..... | 9 |
| 1.4.2 Objetivos específicos..... | 9 |
| 1.5 Marco teórico..... | 10 |
| 1.5.1 Microorganismos de ambientes extremos..... | 10 |
| 1.5.1.1 Clasificación de los microorganismos extremófilos..... | 13 |
| 1.5.2 Microorganismos termófilos..... | 15 |
| 1.5.2.1 Generalidades..... | 15 |
| 1.5.2.2 Hábitat de los microorganismos termófilos... | 16 |
| 1.5.2.3 Taxonomía..... | 21 |
| 1.5.2.4 Mecanismo de supervivencia a altas temperaturas..... | 24 |
| 1.5.3 Enzimas de microorganismos termófilos..... | 28 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.5.4 | Enzimas proteolíticas..... | 31 |
| 1.5.4.1 | Generalidades..... | 31 |
| 1.5.4.2 | Fuentes de proteasas..... | 32 |
| 1.5.4.3 | Proteasas bacterianas..... | 35 |
| 1.5.5 | Importancia de las proteasas termoestables..... | 36 |
| II. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 41 |
| 2.1 | Material biológico..... | 41 |
| 2.2 | Metodología de campo..... | 41 |
| 2.2.1 | Zona de muestreo..... | 42 |
| 2.2.2 | Población de la muestra..... | 44 |
| 2.3 | Metodología de laboratorio..... | 44 |
| 2.3.1 | Pre-enriquecimiento..... | 44 |
| 2.3.2 | Aislamiento y screening..... | 45 |
| 2.3.3 | Caracterización de cultivos bacterianos..... | 47 |
| 2.3.3.1 | Caracterización de las colonias..... | 47 |
| 2.3.3.2 | Coloración Gram..... | 47 |
| 2.3.3.3 | Presencia de esporas..... | 48 |
| 2.3.3.4 | Prueba de motilidad..... | 49 |
| 2.3.3.5 | Prueba de catalasa..... | 50 |
| 2.3.4 | Determinación del tiempo óptimo de la fermentación en medio líquido | 51 |

| | |
|--|----|
| 2.3.5 Determinación de las condiciones óptimas de extracto | |
| Crudo..... | 54 |
| 2.3.5.1 Temperatura óptima..... | 54 |
| 2.3.5.2 pH óptimo..... | 55 |
| 2.3.6 Identificación de los cultivos bacterianos aislados..... | 56 |
| 2.3.6.1 Extracción de ADN..... | 56 |
| 2.3.6.2 Secuenciamiento del gen ARNr 16S..... | 56 |
| 2.4 Análisis estadístico..... | 57 |
| III. RESULTADOS..... | 59 |
| 3.1 Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido..... | 59 |
| 3.1.1 Actividad enzimática en medio sólido de los cultivos bacterianos aislados a 50 °C..... | 60 |
| 3.1.2 Actividad enzimática en medio sólido de los cultivos bacterianos aislados a 60 °C..... | 64 |
| 3.2 Caracterización de los cultivos microbianos..... | 68 |
| 3.2.1 Caracterización de las colonias..... | 68 |
| 3.2.2 Coloración Gram..... | 68 |
| 3.2.3 Presencia de esporas..... | 70 |
| 3.2.4 Prueba de motilidad y prueba de catalasa..... | 70 |
| 3.3 Determinación del tiempo óptimo de la fermentación..... | 71 |
| 3.4 Temperatura óptima..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| 3.5 pH óptimo..... | 85 |
| 3.6 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S..... | 91 |
| IV. DISCUSIÓN | 93 |
| V. CONCLUSIONES..... | 101 |
| VI. RECOMENDACIONES..... | 103 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 104 |
| VIII. ANEXOS..... | 115 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Clasificación de microorganismos extremófilos..... | 14 |
| Tabla 2: Ejemplo de fuentes de microorganismos que pueden proporcionar enzimas termotolerantes..... | 20 |
| Tabla 3: Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables..... | 40 |
| Tabla 4: Ubicación y características físico-químicas de los géiseres muestreados de Calientes..... | 43 |
| Tabla 5: Medio líquido LB: pH: 7.00..... | 45 |
| Tabla 6: Medio de cultivo sólido: SMA pH 7..... | 46 |
| Tabla 7: Medición del halo hidrólisis cada 24 horas cultivo BP-1 y BP-2 a 50 °C..... | 60 |
| Tabla 8: Análisis de varianza del diámetro del halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 aislados de los Géiseres de Calientes..... | 61 |
| Tabla 9: Comparación de medias de los halos de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50°C por el Método de Tukey..... | 62 |
| Tabla 10: Medición del halo hidrólisis cada 24 horas del cultivo BP-1 y BP-2 a 60 °C..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Tabla 11: Análisis de varianza del diámetro del halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C aislados de los Géiseres de Calientes..... | 65 |
| Tabla 12: Comparación de medidas de la medición del halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C por el método de Tukey..... | 66 |
| Tabla 13: Principales características de las colonias aisladas..... | 68 |
| Tabla 14: Principales características microscópicas de los cultivos aislados..... | 68 |
| Tabla 15: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo de incubación del cultivo BP-1 a 60 °C..... | 73 |
| Tabla 16: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo de incubación del cultivo BP-2 a 55 °C..... | 76 |
| Tabla 17: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 con el factor temperatura..... | 79 |
| Tabla 18: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-2 con el factor temperatura..... | 82 |

| | |
|---|----|
| Tabla 19: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 con el factor pH..... | 85 |
| Tabla 20: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-2 con el factor pH..... | 88 |
| Tabla 21: Similitud de secuencias del gen ARNr 16S para los cultivos BP-1 y BP-2..... | 92 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Gráfico que muestra el diámetro final del Halo de Hidrólisis de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50 °C..... | 63 |
| Figura 2: Gráfico que muestra el diámetro final del Halo de Hidrólisis de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C | 67 |
| Figura 3: Fotografía que muestra la coloración Gram del cultivo bacteriano BP-1..... | 69 |
| Figura 4: Fotografía que muestra la coloración Gram del cultivo bacteriano BP-2..... | 69 |
| Figura 5: Gráfico que muestra el crecimiento bacteriano del cultivo BP-1 en la producción de proteasas..... | 71 |
| Figura 6: Gráfico que muestra el crecimiento bacteriano del cultivo BP-2 en la producción de proteasas | 72 |
| Figura 7: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus tiempo de fermentación del cultivo bacteriano BP-1 a 60 °C aislado de Géiseres de Calientes..... | 74 |
| Figura 8: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus tiempo de fermentación del cultivo bacteriano BP-2 a 55 °C aislado de Géiseres de Calientes | 77 |

| | |
|---|----|
| Figura 9: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes..... | 80 |
| Figura 10: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes..... | 83 |
| Figura 11: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes..... | 86 |
| Figura 12: Gráfico que muestra el modelo de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes..... | 89 |

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de dos cultivos bacterianos a partir de las muestras de agua y sedimento de los géiseres de Calientes, Candarave. Tacna, seleccionándose dos cultivos bacterianos que mostraron actividad enzimática en medio sólido. Siendo el cultivo BP-2 el que mostró un mayor diámetro del halo de hidrólisis a 50 °C, presentando un halo de 45,8 mm y el cultivo BP-1 el que mostró un mayor diámetro del halo a 60 °C después de 96 horas de incubación, mostrando un halo de 85,3 mm. Estos cultivos seleccionados BP-1 y BP-2 lograron degradar una concentración de 1,5175 g/L de caseína en un tiempo estimado de 52,4 horas de incubación y 2,9197 g/L de caseína a las 50,6 horas de incubación respectivamente. Mostrando su máxima actividad enzimática al final de la fase logarítmica y comienzos de la fase estacionaria. La temperatura óptima estimada para los extractos proteolíticos crudos producidos por los cultivos BP-1 y BP-2 fue 63,9 °C y 57 °C con un pH óptimo estimado de 8 y 7,65 para los cultivos BP-1 y BP-2. En base al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S se considera que el cultivo BP-1 posee un 99 % de similitud a la especie *Geobacillus* sp. NBRC 15313, mientras que el cultivo BP-2 presentó un 99 % de similitud a la especie *Bacillus licheniformis*.

ABSTRACT

The isolation of two bacterial cultures was performed from samples of water and sediment geysers Calientes, Candarave. Tacna, the selected two bacterial cultures showed enzyme activity in solid medium. Cultivation being BP-2 that showed higher zone diameter hydrolysis at 50 °C, having a 45,8 mm halo and cultivation showed BP-1 zone diameter greater than 60 °C after 96 hours incubation, showing a halo 85,3 mm. These selected BP-1 and BP-2 cultures had effectively degrade a concentration of 1,5175 g/L of casein in an estimated 52,4 hours incubation time and 2,9197 g/L of casein to 50,6 hours of incubation respectively. Showing its maximum enzymatic activity at the end of the logarithmic phase and early stationary phase. The estimated proteolytic crude extracts produced by BP-1 and BP-2 crops optimum temperature was 63,9 °C and 57 °C with an estimated optimum pH of 8 and 7,65 for BP-1 and BP-2 cultures.

Based on sequence analysis of 16S rRNA gene is considered that cultivation BP-1 has a 99 % similarity to the species *Geobacillus* sp. NBRC 15313 while growing BP-2 presented a 99 % similarity to the species *Bacillus licheniformis*.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos se caracterizan por habitar en ambientes en los cuales las condiciones físicas son críticas con respecto a las condiciones “normales” (temperaturas altas o muy bajas, valores de pH extremadamente ácidos ó básicos, ausencia de oxígeno, salinidad, presión, entre otras), sin embargo, estos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse bajo estas condiciones (Castillo, 2005).

Dentro del grupo de los microorganismos extremófilos se encuentran los termófilos, los cuales están adaptados para crecer óptimamente a temperaturas altas (45 °C a 110 °C). Estos microorganismos han sido aislados a partir de fuentes termales marinas y terrestres, tales como: áreas volcánicas, fumarolas negras, sistemas hidrotermales marinos, reservorios de petróleo, entre otros hábitats naturales, pero también se han aislado a partir de ambientes antropogénicos como el compost, materia orgánica en descomposición y aguas residuales de procesos industriales (Castillo, 2005).

Los microorganismos termófilos han sido los menos explorados debido a las dificultades en el aislamiento y el mantenimiento de un cultivo puro. Por lo tanto, queda por explorar su diversidad y potencial biotecnológico de la mayoría de los hábitats térmicos. Como consecuencia estos microorganismos poseen propiedades macromoleculares únicas a altas temperaturas ya que poseen altas tasas metabólicas, sus enzimas físicamente y químicamente estables y un crecimiento menor, pero con altos rendimientos del producto final, los cuales son similares especies mesófilas (Kikani *et al.*, 2010). Además los termófilos de ecosistemas acuáticos extremos forman una única fuente de enzimas termoestables que ofrecen muchas ventajas en comparación a sus homólogos mesófilas. Siendo las bacterias termófilas las principales fuentes de enzimas termoestables lo suficientemente ventajosas en virtud de su alta temperatura la estabilidad, la prevención de la contaminación microbiana mesófila (Kikani *et al.*, 2010). Además debido al crecimiento de la industrialización, la demanda de enzimas termoestables ha aumentado enormemente, por su alta termoestabilidad y la viabilidad de los procesos involucrados. Siendo las proteasas unas de las principales enzimas en la industria ya que constituyen mas de 60 % del mercado mundial y ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, textil y cuero (Rao *et al.*, 1998).

El presente trabajo de investigación tiene la finalidad de identificar los microorganismos con capacidad de producir proteasas a temperaturas elevadas, provenientes del campo geotermal de Calientes en Candarave-Tacna que es el más alto del mundo por lo que es de gran importancia e interés científico conocer la biodiversidad de estos microorganismos para su posible aplicación en el campo de la biotecnología.

1.1 Planteamiento del Problema

Para el siguiente trabajo se plantea la siguiente pregunta:

¿Existen bacterias termófilas con capacidad de producir enzimas proteolíticas en los géiseres de Calientes, Candarave - Tacna?

1.2 Hipótesis

En los géiseres de Calientes, existen bacterias termófilas con capacidad de producir enzimas proteolíticas de los géneros, *Bacillus* y *Geobacillus*.

1.3 Justificación

El aislamiento e identificación de microorganismos presentes en un ambiente natural es el primer paso de una investigación para poder determinar las propiedades y características particulares de las diferentes especies presentes y los metabolitos o enzimas extracelulares que pueden producir. Y el estudio de microorganismos termófilos y sus enzimas ha tenido gran impacto en el campo de la biocatálisis ya que estos microorganismos están adaptados para sobrevivir en nichos ecológicos en donde prevalecen altas temperaturas. El hecho de que los microorganismos termófilos y termotolerantes sean capaces de sobre vivir bajo condiciones no-convencionales podría indicar que estos han desarrollado propiedades enzimáticas que les permite sobrevivir y adaptarse en tales ambientes (Jaenicke, 1991).

El presente trabajo se centra estudio de bacterias con capacidad de producir enzimas proteolíticas termoestables, sin embargo existen otras fuentes de proteasas como plantas y animales, pero los microorganismos especialmente las bacterias se han convertido en las principales fuentes comerciales para la

producción de proteasas y otras enzimas, debido a su capacidad para ser cultivados en gran escala en un tiempo corto de fermentación con abundante producto deseado (Zilda *et al.*, 2012).

Las enzimas termoestables pueden tener un gran número de aplicaciones comerciales (Haki & Rakshit, 2003). Siendo las proteasas una de las más importantes enzimas comerciales ya que representan el 65 % del mercado mundial de enzimas (Rao *et al.*, 1998) y estas enzimas son usadas ampliamente en la industria de alimentos, farmacéutica, piel e industria textil. Por lo que estas aplicaciones se pueden incrementar en el futuro, debido a la necesidad de enzimas termoestables que puedan actuar bajo condiciones no habituales, por ejemplo a temperaturas superiores a 45 °C (Haki & Rakshit, 2003).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Aislar e identificar bacterias termófilas que manifiesten actividad proteolítica, obtenidas de los géiseres de Calientes, Candarave-Tacna.

1.4.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias termófilas productoras de proteasas.
- Determinar la actividad enzimática en medio sólido para cada una de los cultivos bacterianos aislados.
- Conocer el tiempo óptimo de la fermentación en medio líquido
- Establecer las condiciones óptimas de pH y temperatura del extracto crudo proteolítico producido.
- Identificar molecularmente las bacterias termófilas proteolíticas aisladas.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Microorganismos de ambientes extremos

Los extremófilos son microorganismos que pueden crecer y prosperar en ambientes extremos, que antes se consideraban demasiado hostiles para sustentar la vida (Gomes & Steiner, 2004). Entre estos ambientes se encuentran fuentes hidrotermales, fuentes termales ácidas, lagos carbonatados, sedimentos oceánicos profundos y salinos. Algunos ambientes antropogénicos pueden considerarse también como extremos como son los calentadores de agua, efluentes termales de plantas eléctricas, acúmulos de abono, ensilados, intercambiadores de calor y evaporadores de industrias lácteas (Burgess *et al.*, 2009).

Las condiciones extremas pueden ser de alta o baja temperatura, el pH alto o bajo, alta salinidad, concentraciones elevadas de metales, muy bajo contenido de nutrientes, actividad de agua muy baja, alta radiación,

alta presión y baja tensión de oxígeno. Sin embargo estos microorganismos están adaptados estructuralmente a nivel molecular para soportar estas duras condiciones y siendo bastante frecuente que estos microorganismos vivan en biotopos que combinan dos o más factores extremos como por ejemplo, altas temperaturas y condiciones ácidas, temperatura baja y alta presión, etc. (Gomes & Steiner, 2004)

Bajo la denominación de extremófilos se incluye diferentes taxones de procariotas (Bacteria y Archaea) y eucariotas. Entre las procariotas destacan la Arqueobacterias como los microorganismos mas abundantes en estos ambientes extremos (Castillo, 2005), pero ciertas especies de dominio Bacteria también tienen el mismo potencial para adaptarse a condiciones extremas (Chandra *et al.*, 2013).

Los extremófilos presentan un interés biológico diversificado. En primer lugar, son taxones nuevos, además, sus biomoléculas son resistentes a las condiciones

agresivas de su entorno, lo que ha conducido a intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos básicos de resistencia, así como para desarrollar aplicaciones industriales. De interés particular son las enzimas que ayudan a los extremófilos a funcionar en las circunstancias extremas de su entorno (Castillo, 2005).

La extremoenzimas son excepcionalmente estables en condiciones extremas, por lo que ofrecerán nuevas oportunidades en el campo de la biotecnología. Por ejemplo enzimas como celulasas, amilasas, xilanasas, proteasas, pectinasas, queratinasas, lipasas, esterases, catalasas, peroxidasas y fitasas han encontrado un gran potencial de aplicación en diversos procesos biotecnológicos en la actualidad (Chandra *et al.*, 2013).

1.5.1.1 Clasificación de los microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos dependiendo de la condición extrema bajo la cual estén sometidos constituyen varios grupos fisiológicos conocidos como barófilos, alcalófilos, acidófilos, halófilos, psicrófilos, termófilos e hipertermófilos (Mosé *et al.*, 2002).

Tabla 1: Clasificación de microorganismos extremófilos

| Extremófilos | Mínimo | Óptimo | Máximo |
|----------------------|---------------|-------------------|---------------|
| Termófilos | | > 50°C | > 60 °C |
| Termófilos extremos | >35 °C | ≥ 65°C | > 70 °C |
| Hipertermófilos | >60 °C | ≥80°C | > 85 °C |
| Acidófilos | pH >0 | 2,5 ≤ pH ≤ 3,0 | |
| Alcalinotolerantes | | pH <8,5 | pH ≥ 9,0 |
| Alcalófilos | | pH ≥ 8,5 | pH ≥ 10 |
| Halófilos tolerantes | | 2 % ≤ NaCl ≤ 5% | |
| Halófilos moderados | | 5 % ≤ NaCl ≤ 20% | |
| Halófilos extremos | | 20 % ≤ NaCl ≤ 30% | |
| Psicrófilos | =0 °C | < 25-30°C | |
| Barófilos | 0,1 MPa | =10-50 MPa | 100 MPa |

Fuente: Ollivier *et al.*, 2000

1.5.2 Microorganismos termófilos

1.5.2.1 Generalidades

Mientras chimeneas termales y aguas termales se consideran algunos de los ambientes más extremos de la tierra, muchos microorganismos son capaces de prosperar en estos lugares hostiles. Entre estos microorganismos encontramos a los termófilos e hipertermófilos. A pesar que los dos comparten adaptaciones similares para sobrevivir en estos ambientes extremos difieren en su temperatura óptima de crecimiento (Reed *et al.*, 2013).

Los microorganismos cuya temperatura óptima está por encima de 45 °C se denominan termófilos y aquellos cuya temperatura óptima está por encima de 80 °C, son conocidos como hipertermófilos. Sin embargo, se cree poco probable que los microorganismos puedan sobrevivir a temperaturas

superiores a 150 °C, como la cohesión de ADN y otras moléculas vitales se comienzan a romper en este punto (Madigan *et al.*, 2005).

Estos microorganismos suelen crecer muy rápidamente y se han encontrado todo tipo de morfologías y de tipos fisiológicos, hay especies tanto aerobias como anaerobias. Sus enzimas son gran interés, no solo en el aspecto biológico sino también por sus prometedoras ventajas en la industria y la biotecnología (Castillo, 2005).

1.5.2.2 Hábitat de los microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos se encuentran distribuidos en una gran variedad de ambientes, como manantiales termales, desiertos, géiseres, chimeneas subterráneas, sistemas hidrotermales marinos, solfataras, y suelos geotérmicamente calientes (Marteinsson *et al.*, 2001).

Metabólicamente, los microorganismos termófilos e hipertermófilos pueden ser anoxigénicos y oxigénicos, fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimiolitioautótrofos ó quimiorganótrofos (heterótrofos) y su diversidad metabólica está reflejada en la diversidad de hábitats que ocupan, donde la luz y la amplia cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos asociados a los sistemas hidrotermales pueden servir como fuente de energía (Reysenbach *et al.*, 2002).

Estas áreas geotérmicas se limitan a unos pocos lugares en el mundo donde la actividad volcánica está presente, convirtiéndose en hábitats favorables para estos microorganismos (Madigan *et al.*, 2005). Siendo la temperatura de las aguas termales en zonas geotérmicas muy constante, no variando más de 2.1 °C a lo largo de muchos años, incluso aunque la temperatura entre las aguas termales puede variar enormemente, desde 20 °C hasta a por encima de 100 °C dependiendo de la ubicación y la presión.

Estos sistemas geotérmicos por lo general contienen sulfuro y azufre elemental. El azufre elemental se forma a partir del H₂S de origen geotérmico, bien sea por oxidación espontánea de H₂S con O₂ o bien por una reacción del H₂S con el SO₂ (este último es un componente de los gases volcánicos) (Madigan *et al.*, 2005).

Cuando el agua caliente no puede circular libremente debajo de la superficie, tiene que salir intermitentemente por la presión generada que se acumula. El fenómeno de géiser ocurre en casos extremos, en el cual el agua y la corriente de vapor brotan hacia la superficie intermitentemente formando fuentes donde el agua alcanza grandes alturas. Encontrándose también una gran diversidad de microorganismos termófilos e hipertermófilos en este tipo de ambientes (McCall, 2005).

Las principales características de las áreas geotérmicas son las bajas concentraciones de

oxígeno. En consecuencia, la mayoría de las especies conocidas de termófilos se clasifican anaerobios obligados o facultativos, aunque actualmente existen aislados aerobios y microaeróbicos (Amend & Shock, 2001).

Sin embargo, también existen ambientes hechos por el hombre, con temperaturas elevadas, tales como las pilas de compost, escoriales, procesos industriales y calentadores de agua en los cuales se ha encontrado una gran variedad de microorganismos termófilos. (Canganella & Wiegel, 2014).

Tabla 2: Ejemplos de fuentes de microorganismos que pueden proporcionar enzimas termotolerantes.

| Fuente | Microorganismo | Enzima |
|--|------------------------------------|-------------------------------|
| Fuente termal | <i>Thermus</i> sp. | α -Amilasa |
| Fuente termal | <i>Bacillus</i> sp. | α -Amilasa |
| Sistemas hidrotermales marinos | <i>Staphylothermus marinus</i> | α -Amilasa |
| Solfataras marinas | <i>Thermococcus litoralis</i> | Pululanasa |
| Fuente termal | <i>Bacillus thermoleovorans</i> | Lipasa |
| Compost de cascara de cítricos fermentada, residuos de extracto de café y té | <i>Bacillus</i> strain MH-1 | Endoquitinasa |
| Compost | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | Proteasa |
| Sistemas hidrotermales marinos | <i>Picrococcus abyssi</i> | Fosfatasa alcalina |
| Sedimentos de fuentes termales | <i>Bacillus</i> sp. | α -Amilasa Proteasa |

Fuente: Haki & Rakshit, 2003

1.5.2.3 Taxonomía

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos pertenecen a los dominios Archaea y Bacteria. El dominio Archaea incluye actualmente los límites más extremos de tolerancia fisiológica a factores físicoquímicos (Garrity *et al.*, 2004).

Los reinos *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* pertenecen a este dominio. Todos los miembros del reino *Crenarchaeota* son organismos termófilos o hipertermófilos, que han sido aislados a partir de sistemas hidrotermales submarinos o continentales. A este reino pertenecen los géneros *Thermoproteus*, *Caldivirga*, *Pyrobaculum*, *Thermocladium*, *Vulcanisaeta*, *Thermofilum*, *Caldisphaera*, *Desulfurococcus*, *Acidilobus*, *Aeropyrum*, *Ignicoccus*, *Staphylothermus*, *Stetteria*, *Sulfophobococcus*, *Thermodiscus*, *Thermosphaera*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus*, *Pyrolobus*, *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Sulfurisphaera* y

Sulfurococcus. Al reino *Euryarchaeota* pertenecen los metanógenos de los géneros *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanothermococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina* y *Methanopyrus* igualmente a este reino pertenecen los géneros *Thermococcus* y *Pyrococcus* que son organótrofos anaerobios y *Archaeoglobus* que es sulfato reductora (Garrity *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el dominio Bacteria los géneros termófilos heterotróficos lo componen el orden *Thermotogales* que incluye seis géneros: *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Petrotoga* y *Marinitoga* (Alain *et al.*, 2002).

El orden *Clostridiales* el cual incluye los géneros *Clostridium*, *Caloramator*, *Caloranaerobacter*, *Thermobrachium*, *Thermohalobacter*, *Anaerobaculum*, *Anaerobranca*,

Caldicellulosiruptor, *Carboydocella*,
Syntrophothermus, *Thermaerobacter*,
Thermanaerovibrio, *Thermohydrogenium* y
Thermosyntropha (Sokolova et al., 2001); el orden
Thermomicrobiales que está representado por el
género *Thermomicrobium*; el orden
Deferribacteriales que incluye los géneros
Deferribacter y *Thermothrix*; el orden
Thermoanaerobacteriales que incluye los géneros
Thermoanaerobacter, *Thermoanaerobacterium*,
Ammonifex, *Caldanaerobacter*, *Coprothermobacter*,
Carboxydibrachium, *Gelria*, *Moorella*,
Sporotomaculum, *Thermacetogenium*,
Thermoanaerobium y *Thermavenabulum* y el orden
Bacteroidales que incluye los géneros
Thermodesulfobium, *Acetothermus* y *Anaerophaga*
(Garrity et al., 2004) . El grupo de bacterias sulfato
reductoras está representado por los géneros
Desulfotomaculum, *Desulfacinum*,
Thermodesulforhabdus, *Thermodesulfovibrio* y
Thermodesulfobacterium (Sievert & Kuever, 2000).

Además de los organismos anaerobios del dominio Bacteria aislados de hábitats termofílicos, también se han aislado o identificado microorganismos termófilos e hipertermófilos aerobios heterótrofos y autótrofos. Dentro del grupo de heterótrofos está el género *Thermus*, donde seis especies de este género han sido descritas, estas son *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Thermus filiformis*, *Thermus brockianus*, *Thermus antranikianii*, *Thermus igniterrae* y *Thermus oshimai* (Chung *et al.*, 2000) y el género *Rhodothermus* representado por la especie *Rhodothermus marinus* y el género *Thermoaerobacter* representado por la especie *Thermoaerobacter mariensis* (Garrity *et al.*, 2004).

1.5.2.4 Mecanismo de supervivencia a altas temperaturas

Para poder crecer los microorganismos termófilos e hipertermófilos necesitan de adaptaciones

moleculares a las altas temperaturas. Por lo que el funcionamiento de sus macromoléculas es óptimo a altas temperaturas, sus enzimas y proteínas son termoestables.

Pared celular: Es la parte más externa de las *Archaeas*, disponiéndose alrededor de la célula y protegiendo el contenido celular. No contiene peptidoglicano, lo que les confiere una resistencia natural frente a la lisozima.

La pared más común es una capa superficial paracristalina (capa S) formada por proteínas o glucoproteínas de simetría hexagonal. Una particularidad excepcional viene de la mano del género *Thermoplasma* que carece de pared, carencia que suple gracias al desarrollo de una membrana celular cuya estructura química es única contiene un lípido tetraéter con manosa y glucosa en una proporción muy alta respecto al total de lípidos. Además, se acompaña de glicoproteínas que junto a este lípido, confieren a la membrana de

Thermoplasma spp propiedades de estabilidad frente a las condiciones ácidas y termófilas en las que vive (Gómez & Pérez, 2007).

Membrana citoplasmática: Las membranas celulares de los termófilos e hipertermófilos deben ser también termoestables. Los termófilos típicamente presentan lípidos ricos en ácidos grasos saturados, los cuales permiten que las membranas permanezcan funcionales y estables a altas temperaturas. La membrana de las *Archaeobacterias* se construye sobre un patrón de biftanil tetraéter, estableciéndose pues, enlaces éter (Albers *et al.*, 2000), entre las moléculas de glicerol (que en las *Archaeobacterias* es el L-glicerol) y las cadenas laterales hidrofóbicas que jamás serán de ácidos grasos. Estas cadenas laterales están formadas en su mayoría por unidades repetitivas de isopreno (Albers *et al.*, 2000). En ciertos puntos de la membrana, las cadenas laterales se unen mediante enlaces de tipo covalente y en estos puntos se forma una monocapa. De esta forma la

membrana es mucho más estable y resistente a la desorganización por temperatura que las bicapas de ácidos grasos presentes en los organismos eucariotas y en las bacterias (Gómez & Pérez, 2007).

Proteínas: Varias enzimas termoestables han sido estudiadas y se ha encontrado que su secuencia de aminoácidos difiere en unos pocos residuos de la de enzima que cataliza la misma reacción en un microorganismo mesófilo y esa diferencia parece permitir que la enzima se pliegue de tal manera que sea termoestable. (Madigan *et al.*, 2009).

Como todas las células, los microorganismos hipertermófilos producen chaperonas (proteínas que funcionan reconfigurando, al menos parcialmente, proteínas desnaturalizadas (Madigan *et al.*, 2009).

Ácido desoxirribonucleico (ADN): todos los hipertermófilos producen un determinado tipo de topoisomerasa de ADN, llamada ADN girasa inversa,

que introduce superenrollamientos positivos en la molécula de ADN, esto confiere una mayor estabilidad, haciéndola más resistente a la desnaturalización térmica (Bouzas *et al.*, 2006). Además las *Archaeas sp.* hipertermófilas tienen histonas relacionadas filogenéticamente con las histonas eucariotas (Gómez & Pérez, 2007). Estas histonas ayudan a preservar la estructura de doble hélice del ADN. Tales proteínas incrementan la temperatura de fusión de ADN de hasta 40 °C por encima de los valores normales (Bouzas *et al.*, 2006).

1.5.3 Enzimas de microorganismos termófilos

Los biocatalizadores llamados extremoenzimas, producidas por microorganismos extremófilos, son proteínas que funcionan en condiciones extremas y debido a su estabilidad bajo estas condiciones, pueden ofrecer nuevas oportunidades para la biocatálisis y biotransformación. Algunos ejemplos de extremoenzimas incluyen las celulasas, amilasas, xilanasas, proteasas, pectinasas,

queratinasas, lipasas, esterases, catalasas, peroxidasas y fitasas, que tienen un gran potencial para la aplicación en diversos procesos biotecnológicos (Gomes & Steiner, 2004); sin embargo las enzimas tolerantes al calor son actualmente las más investigadas de todas las extremoenzimas, ya que no sólo sirven como excelentes modelos para la comprensión de la estabilidad de proteínas, sino también por su importante potencial biotecnológico (Eichler, 2001).

Las enzimas termoestables son de gran interés industrial y biotecnológico debido al hecho que sus enzimas se adaptan a los duros procesos industriales (Haki & Rakshit, 2003).

Entre las principales ventajas que nos ofrecen las termoenzimas tenemos: la reducción de los riesgos de contaminación por mesófilos comunes. Además, las enzimas de microorganismos termófilos son más estables a temperaturas convencionales que las enzimas de microorganismos mesófilos, prolongando la vida media de

productos comerciales. Por lo que tales enzimas pueden ser usadas también como modelos para la comprensión de la termoestabilidad y termoactividad, las cuales son útiles para la ingeniería de proteínas (Haki & Rakshit, 2003).

El hallazgo inesperado de que estas enzimas se pueden clonar y expresado en huéspedes mesófilas sin perder su activo conformación y termoestabilidad resuelven la producción inicial problema. En este sentido, la disponibilidad de un creciente número de enzimas termoestables abrió nuevas posibilidades para los procesos industriales. Debido a su estabilidad inherente general, tales enzimas han encontrado aplicaciones comerciales en el industria del almidón, en la síntesis de aminoácidos, en el petróleo, industrias químicas, papel y en muchos otros campos (Bouzas *et al.*, 2006).

1.5.4 Enzimas proteolíticas

1.5.4.1 Generalidades

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas (EC 3.4), ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas constituyen un grupo muy grande y complejo de enzimas, ampliamente utilizados en la industria. Ellos juegan un papel importante en la biotecnología industrial (Jisha *et al.*, 2013), y constituyendo más del 65 % del mercado mundial de enzimas, las cuales son ampliamente

empleadas en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y del cuero (Haki & Rakshit, 2003).

1.5.4.2 Fuentes de proteasas

Hay una diversidad de fuentes de proteasas y éstas pueden obtenerse a partir de plantas, animales y microorganismos.

a. De origen animal: Entre las proteasas de origen animal encontramos a la tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y la renina. La tripsina es la principal enzima digestiva intestinal responsable de la hidrólisis de proteínas de los alimentos (Jisha *et al.*, 2013). Estas enzimas son producidas muy puras en cantidades industriales, sin embargo, su producción depende de la disponibilidad del ganado para su sacrificio debido a que son extraídas del páncreas de estos (Rao y *et al.*, 1998).

b. De origen vegetal: El uso de las plantas como fuente de proteasas se rige por varios factores, como la disponibilidad de tierras para el cultivo y la idoneidad de las condiciones climáticas para el crecimiento. Por otra parte, la producción de proteasas de plantas es un proceso que consume tiempo. La papaína, bromelina, queratinasas y ficina representan algunas de las proteasas conocidas de origen vegetal (Jisha *et al.*, 2013).

c. De origen microbiano: Existe una gran variedad de proteasas producidas por microorganismos en función de las especies del productor o las cepas, aun perteneciendo a la misma especie. Debido a la incapacidad de las proteasas de plantas y animales para satisfacer las demandas del mundo actual han llevado a un creciente interés en proteasas microbianas (Lata *et al.*, 2014).

Actualmente los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas debido a su amplia diversidad bioquímica y su susceptibilidad a la manipulación genética. Las proteasas microbianas representan aproximadamente el 40 % del total mundial las ventas de la enzima. Además las proteasas de origen microbiano son más preferidas que las enzimas obtenidas a partir de fuentes vegetales y animales, ya que los microorganismos poseen casi todas las características deseadas por sus aplicaciones biotecnológicas (Lata *et al.*, 2014).

Estos microorganismos ofrecen múltiples ventajas que no pueden ofrecer las plantas y animales, tales como: una fácil manipulación, su rápido crecimiento, las limitaciones de espacio necesario para su cultivo y la facilidad con la que pueden ser manipuladas genéticamente para generar nuevas enzimas con propiedades alteradas que son deseables para los sus

diversas aplicaciones que sean de especial interés para los investigadores de todo el mundo (Lata *et al.*, 2014).

1.5.4.3 Proteasas bacterianas

Las proteasas bacterianas son las fuentes más significativas de enzimas, en comparación con las proteasas producidas por animales, plantas y hongos (Olajuyigbe & Ajele, 2005).

La mayoría de las proteasas comerciales son de origen bacteriano (Prakasham *et al.*, 2006). Aunque estas proteasas son producidas por diversas bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter*, *Thermoactinomyces* y especies pertenecientes a *Streptomyces* y *Bacillus* (Horikoshi, 1999).

Siendo el género *Bacillus* una de las principales fuentes que segrega una variedad de enzimas extracelulares solubles (Horikoshi, 1999). Ya que la mayoría de las proteasas comerciales son producidos por este género por ejemplo, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus* y *B. subtilis*, *B. sterothermophilus*, *B. mojavensis*, *B. megaterium* (Horikoshi, 1999).

1.5.5 Importancia de las proteasas termoestables

La importancia que han adquirido las proteasas termoestables se debe a que pueden ser aplicadas en procesos que se llevan a cabo a temperaturas elevadas (> 50 °C) y valores extremos de pH, tales como la industria peletera, lavado de equipo (sanitización), alimentos, farmacéutica, obtención de hidrolizados de proteína, fotografía, papel, entre otros (Haki & Rakshit, 2003). Por lo que las proteasas termoestables son inusualmente estables a altas temperaturas (comparadas con sus contrapartes mesófilas), lo que les concede ventajas como modelo de estudio de los

mecanismos fisicoquímicos y estructurales que confieren termoestabilidad enzimática (Zhu *et al.*, 2007).

El entendimiento de los factores que confieren estabilidad catalítica a altas temperaturas permite explicar los mecanismos de plegamiento y estabilidad estructural, y en consecuencia conlleva a efectuar diseños enzimáticos catalíticamente termorresistentes (Kumar & Nussinov, 2001).

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos son capaces de producir un abundante número de proteasas, ya sea intra o extracelulares con diferente especificidad de sustrato. Una importante proporción de proteasas producidas por microorganismos termófilos pertenecen a la familia de las subtilisinas (Almog *et al.*, 2003).

A pesar de que varias proteasas termoestables son estructuralmente similares a las mesófilas previamente caracterizadas, aun se siguen identificando nuevas estructuras (Almog *et al.*, 2003).

Las enzimas termoestables se pueden clasificar en tres grupos, de acuerdo al rango de temperatura de estabilidad: termoestables moderadas (45-65 °C), termoestables (65-85 °C) y termoestables extremas (>85 °C) (Demijaran *et al.*, 2001).

Actualmente, el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad, sin embargo la experiencia práctica de la ingeniería de proteínas ha demostrado que es posible producir enzimas termoestables a partir de microorganismos termófilos (Yano & Poulos, 2003).

La importancia que han adquirido las enzimas termoestables es debida a que pueden ser utilizadas en procesos industriales exigentes tales como la industria de la piel, lavado de equipo a temperaturas elevadas, la industria de lácteos, la industria del almidón, farmacéutica, de alimentos, textil, síntesis de aminoácidos, hidrolizados de proteína, síntesis orgánica, petróleo, química y papel (Haki & Rakshit, 2003). Asimismo, la operación a altas temperaturas tiene influencia significativa en la viabilidad y solubilidad de

compuestos orgánicos; por ello las enzimas termoestables también son usadas en biorremediación (Becker, 1997) reacciones que no podía ser posible realizarlas por enzimas mesófilas y por catálisis química.

Por la viabilidad que tienen las enzimas termoestables esta les proporciona la característica para poder ser utilizadas en nuevas aplicaciones en el futuro (Haki & Rakshit, 2003).

Tabla 3: Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables.

| Enzima | Temperatura óptima (°C) | Bioconversión | Aplicación |
|-------------------|-------------------------|---|--|
| α -Amilasa | 50-60 | Almidón-jarabe de dextrosa | Producción de maltosa |
| Celulasa | 45-55, 95 | Celulosa-glucosa | Hidrólisis de celulosa, degradación de polímeros en detergente |
| Proteasa | 65-85 | Proteína-aminoácidos y péptidos | Detergentes, industria de la piel y fotografía. |
| Lipasa | 30-70 | Remoción de grasas, hidrolisis, interesterificación, alcoholisis, aminólisis. | Lácteos, detergentes, farmacéutica, cosméticos. Industria de la piel |
| DNA polimerasa | 90-95 | Amplificación de DNA | Ingeniería genética/PCR |

Fuente: (Haki & Rakshid, 2003).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

- Bacterias termófilas productoras de proteasas.
- Enzima proteasa producida por *Geobacillus* sp. y *Bacillus licheniformis*.

2.2 Metodología de campo

El muestreo se realizó en Diciembre del 2012. Tomándose muestras de agua y sedimento de 8 géiseres de Calientes en la provincia de Candarave en la ciudad de Tacna. La temperatura del agua varió desde 50 hasta 84 °C y el pH desde 6,18 hasta 7,53.

Para las muestras de agua se usaron recipientes plásticos estériles de 5 litros y para el sedimento se utilizaron recipientes plásticos herméticos de boca ancha, los cuales fueron transportados en una nevera portátil a temperatura ambiente al laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Escuela Académica Profesional de

Biología-Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

2.2.1 Zona de muestreo

Los géiseres de Calientes están ubicados en la Cordillera Occidental en el sur del Perú, 17° 15' 30" latitud sur a 4 400 m.s.n.m. en la provincia de Candarave, en la Región Tacna, Perú (Cruz *et al.*, 2010).

Escogiéndose 8 géiseres, los cuales presentaron las siguientes características.

Tabla 4: Ubicación y características físico-químicas de los géiseres muestreados de Calientes

| Géiser | Coordenada | Temperatura (°C) | pH | Presencia de materia orgánica | Coloración del Géiser |
|--------|-------------------------------|------------------|------|-------------------------------|-----------------------|
| G-A | 1.19 K 0366686 UTM 808351 | 82 | 7,14 | Biofilm | Pardo |
| G-B | 2.19K 0378969 UTM 8108424 | 80 | 6,99 | Vegetación alrededor | Pardo |
| G-C | 3.19K 0378515 UTM 8107756 | 50 | 6,90 | Vegetación alrededor | Verde |
| G-D | 3.19K 0378512 UTM 8107756 | 80 | 7,17 | - | Marrón |
| G-E | 3.19K 0378510 UTM 8107756 | 70 | 7,83 | Vegetación alrededor | Marrón |
| G-F | 1.19 K 0378505 UTM 8107728 | 75 | 6,44 | | Azul |
| G-G | 2.19K 0378550 UTM 810 7597 | 80 | 6,85 | - | Pardo |
| G-H | 3.19K 0378515 UTM 8107582 | 50 | 6,18 | - | Pardo |

K : Posición en la Tierra

UTM: Marcador transversal Universal

Fuente: Elaboración del autor

2.2.2 Población de la muestra

La población de estudio son los microorganismos termófilos presentes en los géiseres de Calientes, Candarave-Tacna, siendo las muestras de estudio los microorganismos termófilos con capacidad de producir proteasas.

2.3 Metodología de laboratorio

2.3.1 Pre-enriquecimiento

Una vez obtenidas las muestras de agua, se tomaron 50 mL de cada uno de los frascos y se mezclaron en un matraz estéril.

De este mix se tomaron 25 mL y se sembraron en 225 mL de medio líquido LB (Remigio *et al.*, 2012)

Luego se incubó a 60 °C por 24 a 48 horas.

Pasada las 24- 48 horas se observó una turbidez, lo que nos indicó un crecimiento bacteriano.

Tabla 5: Medio líquido LB: pH: 7.00

| COMPONENTES | g/L |
|----------------------|------------|
| Triptona | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| NaCl | 10 |

Fuente: Remigio *et al.*, 2012.

2.3.2 Aislamiento y screening

A partir de estos matraces que presentaron una densidad bacteriana de 10^7 células/mL y se realizó diluciones necesarias con el fin de obtener cepas más aisladas.

Luego se sembró por superficie 0,1 mL de estas diluciones sobre placas que contenían agar leche descremada. Posteriormente se incubó a 60 °C y por 24 a 48 horas para la observación del halo de hidrólisis.

Las cepas proteolíticas aisladas se purificaron a través del uso repetido de esta técnica para obtener cultivos axénicos y fueron conservadas en tubos con tapa rosca con medio sólido LB a 4 °C.

Para la evaluación del screening los cultivos aislados fueron sembrados en placas que contenían agar leche descremada y sometidos a diferentes temperaturas: a 50 y 60 °C por 96 horas, realizándose la medición de los halos de hidrólisis cada 24 horas (Zilda *et al.*, 2012).

Tabla 6: Medio de cultivo sólido: SMA pH 7

| Componentes | % |
|--|----------|
| Leche descremada | 5 |
| NaCl | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,1 |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O, | 0,01 |
| Extracto de Levadura | 0,05 |
| Agar | 1,5 |

Fuente: Zilda *et al.*, 2012

Nota: La leche descremada fue esterilizada a 110 °C por 10 min.

2.3.3 Caracterización de los cultivos bacterianos

2.3.3.1 Caracterización de las colonias

Una vez aislado los cultivos se caracterizó morfológicamente a las colonias según su color forma, borde y elevación.

2.3.3.2 Coloración Gram (Forbes *et al.*, 2009)

Una vez fijada la muestra, se cubrió el portaobjetos con cristal violeta (violeta de genciana al 1 %) y se dejó entre 30 segundos a 1 minuto. Se enjuagó el portaobjetos con agua corriente para eliminar el exceso.

Se cubrió el portaobjetos con yodo para aumentar la afinidad del violeta de genciana y se dejó el doble de tiempo del cristal violeta. 1 a 2 minutos. Se enjuagó con agua de caño para eliminar el exceso.

Se cubrió el portaobjetos con decolorante (alcohol acetona al 30 %) durante 10 segundos y se enjuagó de inmediato con agua de caño. Se repitió este procedimiento hasta que no salga más colorante azul del portaobjetos con el decolorante. Se enjuagó y eliminó y el exceso.

Se cubrió el portaobjetos con un colorante de contraste (safranina) dejándose 30 segundos. Se enjuagó el portaobjetos y se dejó secar al medio ambiente.

Se examinó la muestra con el microscopio con el objetivo de inmersión a 100x para la observación de bacterias.

2.3.3.3 Presencia de esporas (Técnica de Shaeffer y Fulton)

Se realizó el extendido de las colonias bacterianas y fueron fijadas en un portaobjetos.

Se cubrió con verde malaquita y calentó durante 5 a 10 minutos aplicando la llama de un mechero debajo de la llama teniendo mucho cuidado que la preparación no llegue a hervir o secarse.

Se cubrió el portaobjetos con safranina durante 30 segundos.

Se observó al microscopio con el objetivo de inmersión (MacFadin, 2003).

2.3.3.4 Prueba de motilidad

Técnica de gota suspendida (MacFadin, 2003)

Se inoculó las 30 cepas purificadas en tubos de ensayo que contenían medio de caldo de cultivo LB y posteriormente se incubó durante 24 horas.

Se agregó sobre un portaobjetos una gota medio de caldo de cultivo LB con la suspensión bacteriana y se colocó encima un cubreobjetos al que previamente se le ha puesto una base de 4 bolitas pequeñas de plastilina con el objetivo de evitar que aplaste totalmente la gota con la bacteria.

Finalmente se observó al microscopio con un objetivo de inmersión.

Se observó al menos de 5-10 bacterias recorrer todo el campo de visión para declararse una motilidad positiva.

2.3.3.5 Prueba de la catalasa (MacFadin, 2003)

Con la ayuda del asa bacteriológica se recogió el centro de la colonia del cultivo puro de 18 a 24 horas.

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en los cultivos colocados en el portaobjeto con la ayuda de un gotero.

El resultado fue positivo si se observó un burbujeo (Producción de gas).

2.3.4 Determinación tiempo óptimo de la fermentación en medio líquido.

Se inocularon los cultivos aislados y conservados en medio sólido LB con la ayuda del asa bacteriológica en matraces con 100 mL de medio líquido de caseína el cual contenía los mismos componentes que el medio leche descremada, reemplazando la leche por caseína al 1 %. Posteriormente los medios de cultivo fueron incubados a una temperatura de 60 °C y luego se realizó el recuento bacteriano mediante la cámara Neubauer cada 12 horas hasta obtener una densidad bacteriana de 10^8 células por mL.

Una vez obtenida esta densidad microbiana se tomó un inóculo del 10 % a partir de este cultivo y luego se añadió al medio de producción de proteasa (Ghobadi *et al.*, 2009).

Posteriormente se determinó la concentración de proteína inicial del medio líquido de caseína y se realizó la cuantificación cada 12 horas durante 72 horas, mediante el método Bradford para evidenciar la hidrólisis de las proteínas por el extracto crudo producido por los cultivos bacterianos.

Finalmente todo el medio de fermentación se centrifugó a 7000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante de enzima bruta se ensayó para la actividad proteolítica y se utilizó para la purificación adicional.

Cuantificación de las proteínas

Para la cuantificación de proteínas extracelulares las cepas aisladas fueron cultivadas en medio líquido de caseína (10 g/L) por 72 horas.

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Anexo 6.

Cuantificación de proteínas extracelulares (Bradford, 1976)

Se centrifugó las muestras por 30 minutos a 5000 rpm y se retiró el sobrenadante.

La cuantificación se realizó por duplicado utilizando 100 μ L del sobrenadante y luego se agregó 1 mL de reactivo de Bradford.

Se realizó las determinaciones en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 595 nm, utilizando como muestra testigo 50 μ L de agua destilada más 1 mL de reactivo de Bradford.

Con los datos obtenidos en la curva de calibración se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración de proteínas extracelulares en la muestra:

$$\text{Proteínas (g/L)} = (\text{Abs.} - \text{intercepto}) / \text{Pendiente}$$

Posteriormente se realizó la determinación de las proteínas hidrolizados mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Proteínas hidrolizadas (g/L)} = \text{Proteínas iniciales} - \text{Proteínas finales}$$

2.3.5 Determinación de las condiciones óptimas de extracto crudo

2.3.5.1 Temperatura óptima

Se siguió la misma metodología descrita para la determinación de la actividad enzimática por el método de Bradford, pero se varió la temperatura de reacción entre la caseína y el extracto proteolítico para las muestras: Teniendo en cuenta las siguientes temperaturas 45, 55, 65 y 75 °C en una hora de reacción.

El método de Bradford se realizó sin ninguna alteración. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para la obtención de la temperatura óptima estimada se graficó la concentración de proteínas hidrolizadas correspondiente a la temperatura utilizada.

2.3.5.2 pH óptimo

Para esta determinación se siguió la metodología de la actividad enzimática por el método de Bradford, sólo que en este caso se varió el pH en el cual estuvo disuelta la caseína al 1 %.

Para el pH de 6 a 7 se preparó el buffer fosfato de sodio 50 mM; y 50 mM de buffer Tris-HCl para el pH de 8 y 9. Las mezcla de reacción se incubaron durante 1 hora y posteriormente se

determinó la concentración de proteínas extracelulares g/L. (Aqel *et al.*, 2012).

Para la obtención del pH óptimo estimado se graficó la concentración de proteínas hidrolizadas correspondiente al pH que fue utilizado.

2.3.6 Identificación de los cultivos bacterianos aislados

2.3.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico de los cultivos bacterianos aislados, se utilizó el kit “Wizard Genomic DNA Purification” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (Anexo 8).

2.3.6.2 Secuenciamiento del gen RNA r 16S

Una vez extraído el ADN, este fue enviado MacroGen (Corea), donde fueron secuenciados aproximadamente 1500 pb del gen ARNr 16S.

Para el posicionamiento filogenético de las cepas aisladas se realizó el análisis de cada secuencia en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.4 Análisis estadístico

El tipo de investigación fue básica descriptiva, utilizándose el diseño completamente aleatorio (D. C. A.) descrito por Ríos (2012) con dos repeticiones, donde para la producción de la enzima proteasa y la determinación del tiempo óptimo de la fermentación se utilizó un diseño completamente aleatorio (D. C. A.) descrito por Ríos (2012) con dos repeticiones, donde tuvo 7 tratamientos: 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, y las variable respuesta fue la concentración de proteínas hidrolizadas (g/L).

Para la optimización del extracto crudo proteolítico se utilizó un diseño completamente al azar con dos repeticiones. Donde la temperatura tuvo 5 tratamientos: 45, 55, 65 y 75 °C, siendo la variable respuesta la concentración de proteínas hidrolizadas (g/L). Finalmente para el caso del efecto del pH tuvo 4 tratamientos: 6, 7, 8 y 9 y la variable respuesta fue la concentración de proteínas

hidrolizadas (g/L); Los diseños fueron analizados con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

III. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

Se utilizaron ocho muestras de agua proveniente de los géiseres de Candarave. Pasadas las 24 horas de incubación a 60 °C se observó una turbidez en los matraces lo que indicó el crecimiento bacteriano. Lográndose aislar dos cultivos bacterianos en el medio sólido SMA, donde el criterio de selección fue la aparición de halos de hidrólisis en el medio agar leche descremada.

Se evaluó la actividad enzimática en medio sólido de los dos cultivos bacterianos mediante la medición del halo de hidrólisis cada 24 horas a 50 y 60 °C.

3.1.1 Actividad enzimática en medio sólido de los cultivos bacterianos aislados a 50 °C.

Tabla 7: Medición del halo hidrólisis cada 24 horas del cultivo BP-1 y BP-2 a 50 °C.

| Cultivo | Zona de hidrólisis (mm) | | | |
|---------|-------------------------|------|-------|-------|
| | Tiempo (H) | | | |
| | 24 | 48 | 72 | 96 |
| BP-1 | 0 | 7,45 | 10,45 | 10,46 |
| BP-2 | 14,85 | 27 | 37,45 | 45,8 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8: Análisis de varianza del diámetro del halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50 ° C aislados de los Géiseres de Calientes.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos (Cultivos) | 1 | 2340,1 | 2340,1 | 26,72 | 0,000 |
| Error | 14 | 1226,0 | 87,6 | | |
| Total | 15 | 3566,1 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la tabla 8 se muestra el análisis de varianza de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50 °C, empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable de diámetro del halo de hidrólisis de proteasas, observándose que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro del halo de hidrólisis de proteasas de ambos cultivos bacterianos con un nivel de confianza de 95 %.

Tabla 9: Comparación de medias de los halos de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50 °C por el Método de Tukey.

| Cultivos bacterianos | N | Promedio (mm) | Agrupación |
|-----------------------------|----------|----------------------|-------------------|
| BP-1 | 8 | 7,1 | a |
| BP-2 | 8 | 31,3 | b |

Fuente: Elaboración propia.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95 %

Interpretación

En la tabla 9 se observa que ambos cultivos bacterianos difieren en la letra asignada, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa de los promedios del diámetro del halo de hidrólisis entre ambos cultivos bacterianos. El cultivo BP-2 superó estadísticamente en promedio al cultivo BP-1, mostrando un promedio del diámetro del halo de hidrólisis de 31, 27 mm a una temperatura de 50 °C.

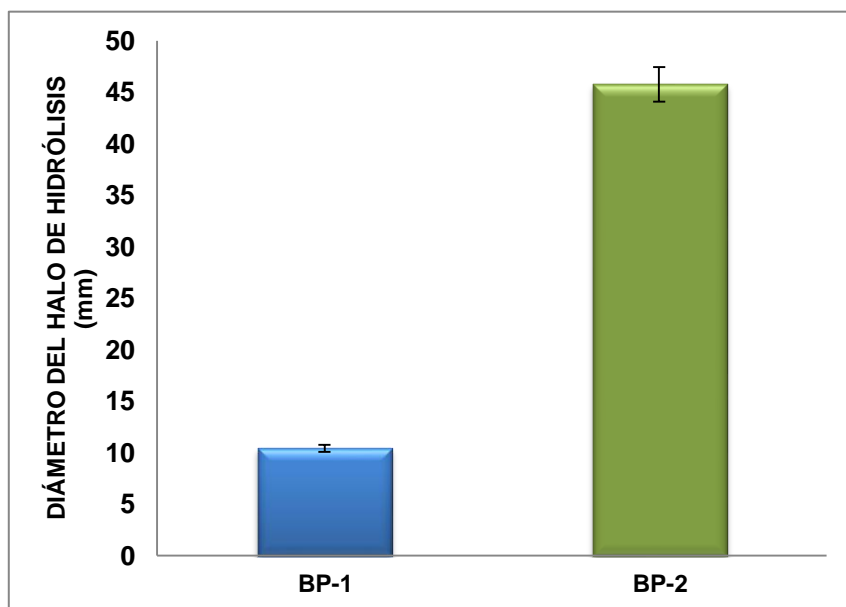


Figura 1: Gráfico que muestra el diámetro final del Halo de Hidrólisis de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 50 °C.

Interpretación

En la figura 1 se observa la medición del halo de hidrólisis a las 96 horas de incubación en medio SMA. Siendo el halo de hidrólisis del cultivo BP-2 superior con un diámetro de 45,8 mm a 50 °C.

3.1.2 Actividad enzimática en medio sólido de los cultivos bacterianos aislados a 60 °C.

Tabla 10: Medición del halo hidrólisis cada 24 horas del cultivo BP-1 y BP-2 a 60 °C.

| Cultivo | Zona de hidrólisis (mm) | | | |
|---------|-------------------------|------|------|------|
| | Tiempo (H) | | | |
| | 24 | 48 | 72 | 96 |
| BP-1 | 73,9 | 79,7 | 83 | 85,3 |
| BP-2 | 5,65 | 11,8 | 20,4 | 22,8 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11: Análisis de varianza del diámetro de halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C aislados de los Géiseres de Calientes.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos (cultivos) | 1 | 17004,2 | 17004,2 | 448,31 | 0,000 |
| Error | 14 | 531,0 | 37,9 | | |
| Total | 15 | 17535,2 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la tabla 11 se muestra el análisis de varianza de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C, empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad; observándose que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro del halo de hidrólisis de proteasas de ambos cultivos bacterianos con un nivel de confianza de 95 %.

Tabla 12: Comparación de medias de la medición del halo de hidrólisis de proteasas de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C por el método de Tukey.

| Cultivos bacterianos | N | Media | Agrupación |
|-----------------------------|----------|--------------|-------------------|
| BP1 | 8 | 80,4 | a |
| BP2 | 8 | 15,2 | b |

Fuente: Elaboración propia.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95 %

Interpretación

En la tabla 12 se observa que ambos cultivos bacterianos difieren en la letra asignada, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa de los promedios del diámetro del halo de hidrólisis entre ambos cultivos bacterianos. El cultivo BP-1 superó estadísticamente en promedio al cultivo BP-2, mostrando un promedio de halo de hidrólisis de 80,36 mm a una temperatura de 60 °C.

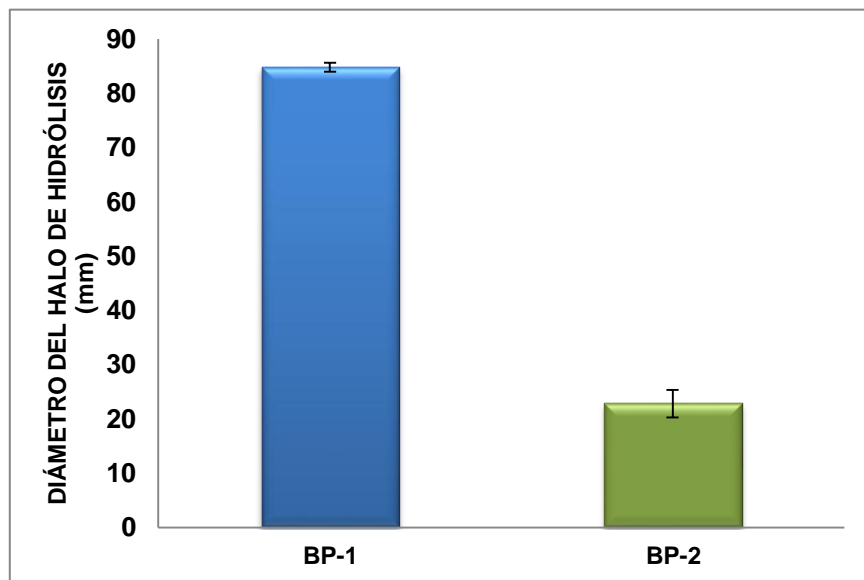


Figura 2: Gráfico que muestra el diámetro final del Halo de Hidrólisis de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 a 60 °C.

Interpretación

En la figura 2 se observa la medición del halo de hidrólisis a las 96 horas de incubación en medio SMA. Siendo el halo de hidrólisis del cultivo BP-1 superior, con un diámetro de 84,85 mm a la temperatura de incubación de 60 °C.

3.2 Caracterización de los cultivos microbianos

3.2.1 Caracterización de las colonias

Tabla 13: Principales características de las colonias aisladas

| Colonia | Características | | | |
|-------------|-----------------|----------|---------|-----------|
| | Color | Forma | Borde | Elevación |
| BP-1 | blanca | circular | crenado | plana |
| BP-2 | blanca | circular | entero | plana |

Fuente: Elaboración propia.

3.2.2 Coloración Gram

Tabla 14: Principales características microscópicas de los cultivos bacterianos aislados.

| Cultivo bacteriano | Coloración Gram | Características |
|--------------------|-----------------|---|
| BP-1 | Gram positivo | Bacilos, largos, gruesos. |
| BP-2 | Gram positivo | Bacilos, cortos, delgados de forma filamentosa. |

Fuente: Elaboración propia.



Figura 3: Fotografía que muestra la coloración Gram del cultivo bacteriano BP-1

Fuente: Elaboracion propia

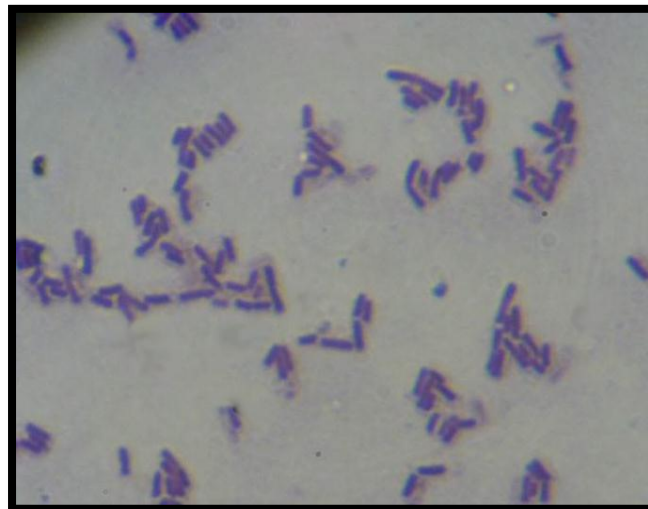


Figura 4: Fotografía que muestra la coloración Gram del cultivo bacteriano BP-2

Fuente: Elaboracion propia

3.2.3 Presencia de esporas

Ambos cultivos bacterianos presentaron esporas.

El cultivo BP-1 presentó esporas ovales y el cultivo BP-2 esporas circulares.

3.2.4 Prueba de motilidad y prueba de la catalasa

| Cultivo bacteriano | Motilidad | Catalasa |
|---------------------------|------------------|-----------------|
| BP-1 | positiva | Positiva |
| BP-2 | positiva | positiva |

Fuente: Elaboración propia.

3.3 Determinación del tiempo óptimo de la fermentación

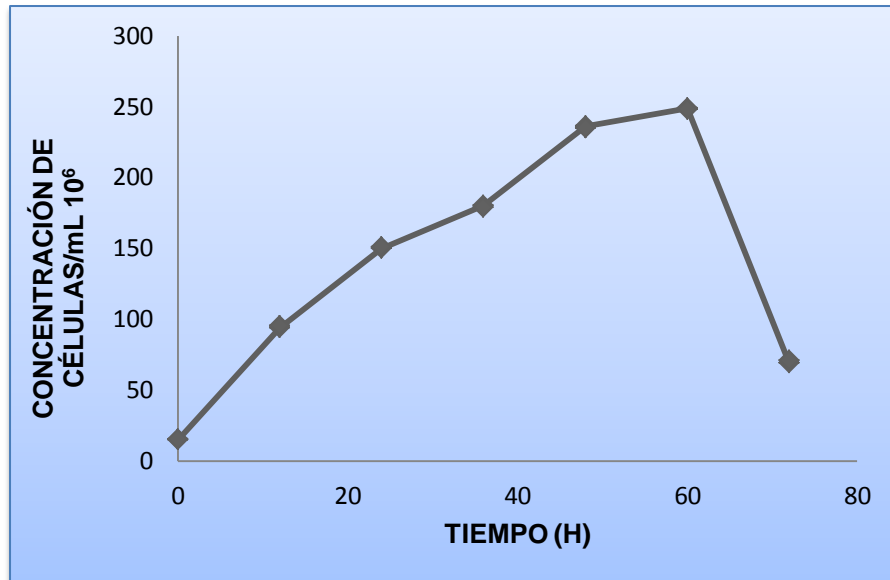


Figura 5: Gráfico que muestra el crecimiento bacteriano del cultivo BP-1 en la producción de proteasas.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la figura 5 se observa la relación entre el tiempo y el crecimiento bacteriano del cultivo BP-1 en la producción del enzima proteasa en medio líquido. Observándose la fase estacionaria después de las 48 horas de incubación.

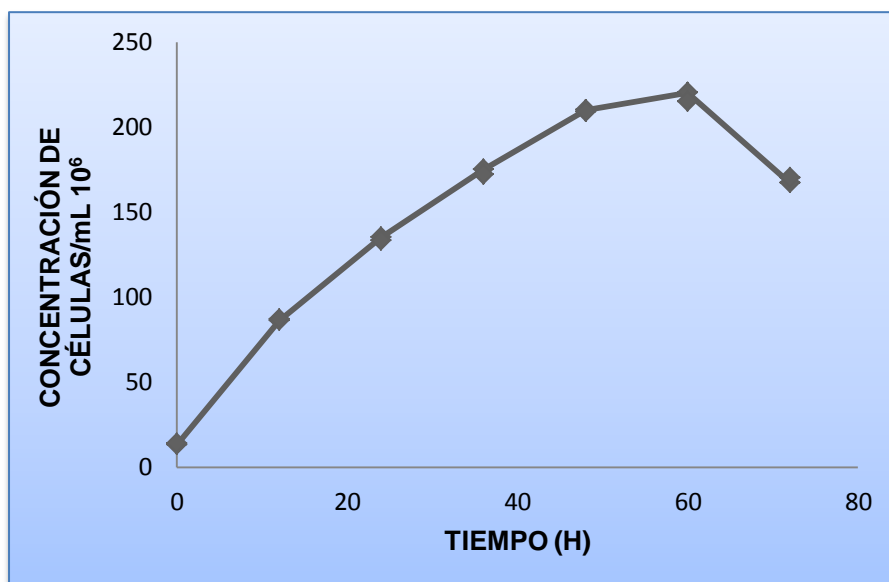


Figura 6: Gráfico que muestra el crecimiento bacteriano del cultivo BP-2 en la producción de proteasas.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la figura 6 se observa la relación entre el tiempo de incubación y el crecimiento bacteriano del cultivo BP-2 en la producción del enzima proteasa en medio líquido. Observándose la fase estacionaria después de las 48 horas de incubación.

Tabla 15: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo de incubación del cultivo BP-1 a 60 °C.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 6 | 3,9380 | 0,6563 | 1701,64 | 0,000 |
| Error | 7 | 0,0027 | 0,0003 | | |
| Total | 13 | 3,9407 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 15 muestra el Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo, observando que el valor P en es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas con un nivel de confianza del 95,0 %.

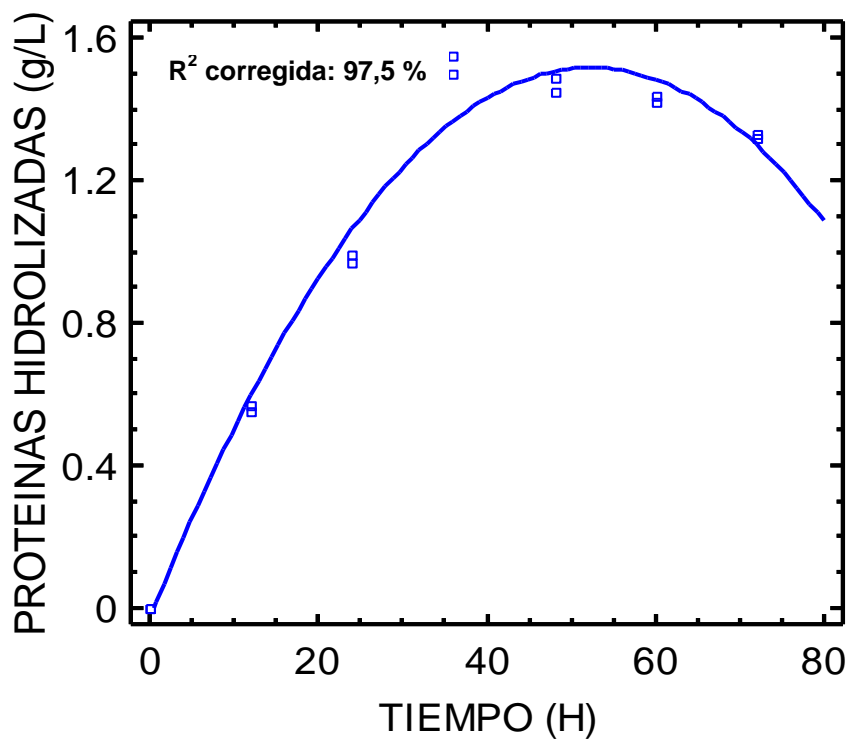


Figura 7: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus tiempo de fermentación del cultivo bacteriano BP-1 a 60 °C aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la figura 7 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre las proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = -0,0296429 + 0,0590923 \cdot \text{Tiempo} - 0,000564236 \cdot \text{Tiempo}^2$$

De la ecuación se obtuvo que el tiempo óptimo estimado a las 52,4 horas con una concentración de proteínas hidrolizadas de 1,51 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 97,5 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas

Tabla 16: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo de incubación del cultivo BP-2 a 55 °C.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 6 | 13,76480 | 2,29413 | 16904,1 | 0,000 |
| Error | 7 | 0,00095 | 0,00014 | | |
| Total | 13 | 13,76575 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 16 muestra el Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor tiempo, observando que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas con un nivel de confianza del 95,0 %. Por lo tanto existe relación entre el tiempo transcurrido en horas y las proteínas hidrolizadas por el cultivo bacteriano BP-2 a 55 °C.

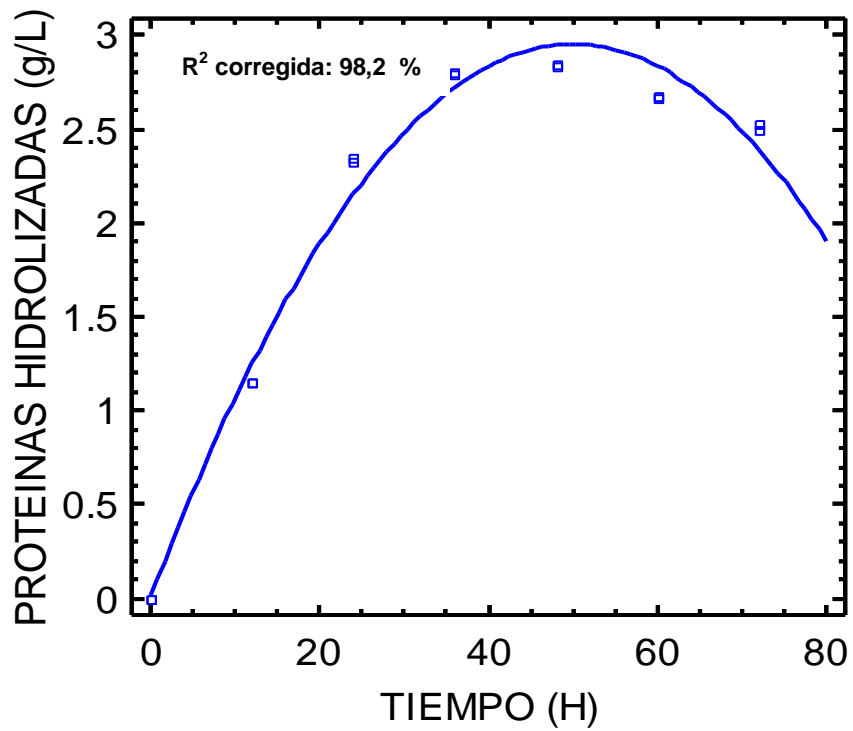


Figura 8: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus tiempo de fermentación del cultivo bacteriano BP-2 a 55 °C aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el figura 8 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre las proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = 0,0279762 + 0,113988 * \text{tiempo} - 0,00112682 * \text{tiempo}^2$$

De la ecuación se obtuvo que el tiempo óptimo estimado es de 50,6 horas y con una concentración de proteínas hidrolizadas de 2,91 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 98,2 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y el tiempo transcurrido en horas.

3.4 Temperatura óptima

Tabla 17: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 con el factor temperatura.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|----------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|---------|
| Tratamientos | 3 | 0,1726375 | 0,0575458 | 657,67 | 0,000 |
| Error | 4 | 0,0003500 | 0,0000875 | | |
| Total | 7 | 0,1729875 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 17 muestra el Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor temperatura observando que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas hidrolizadas y la temperatura de la hidrolisis con un nivel de confianza del 95,0 %. Por lo tanto existe relación entre la temperatura y la concentración de y las proteínas

hidrolizadas (g/L) debido a la hidrólisis del extracto crudo proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1.

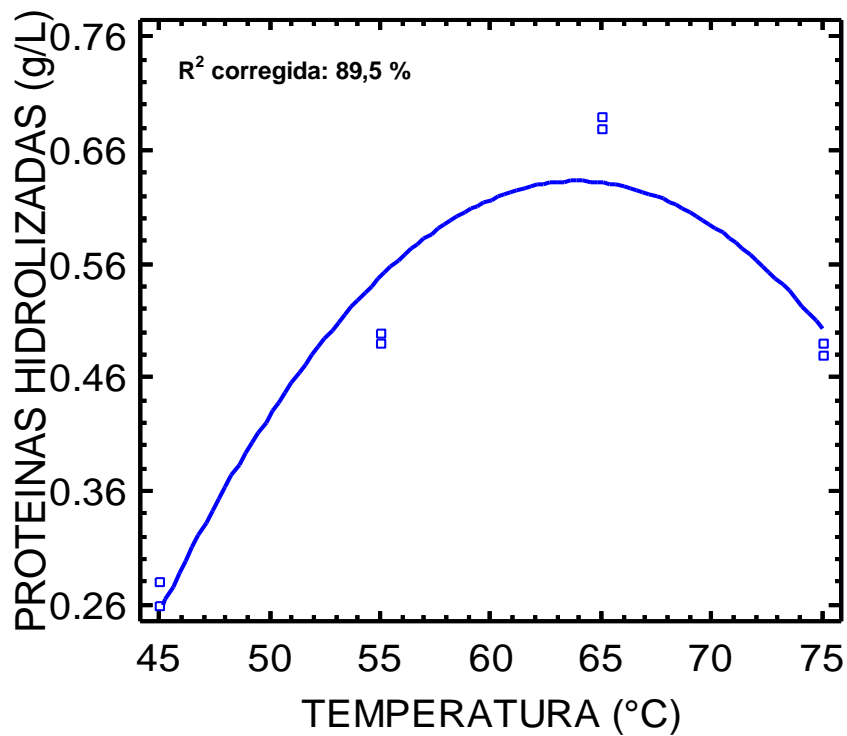


Figura 9: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la Figura 9 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la concentración de proteínas hidrolizadas y la temperatura de hidrólisis. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = -3,70944 + 0,13585 \cdot \text{Temperatura} - 0,0010625 \cdot \text{Temperatura}^2$$

De la ecuación se obtuvo que la temperatura óptima estimada es de 63,93 °C y con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,6329 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 89,5 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y la temperatura de reacción.

Tabla 18: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-2 con el factor temperatura.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 3 | 0,346538 | 0,115513 | 440,05 | 0,000 |
| Error | 4 | 0,001050 | 0,000263 | | |
| Total | 7 | 0,347587 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 18 muestra el análisis de varianza de regresión polinomial observando que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las proteínas hidrolizadas y la temperatura de hidrólisis con un nivel de confianza del 95,0 %. Por lo tanto existe una relación entre la temperatura y la concentración de y las proteínas hidrolizadas (g/L) debido a la hidrólisis del extracto crudo proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2.

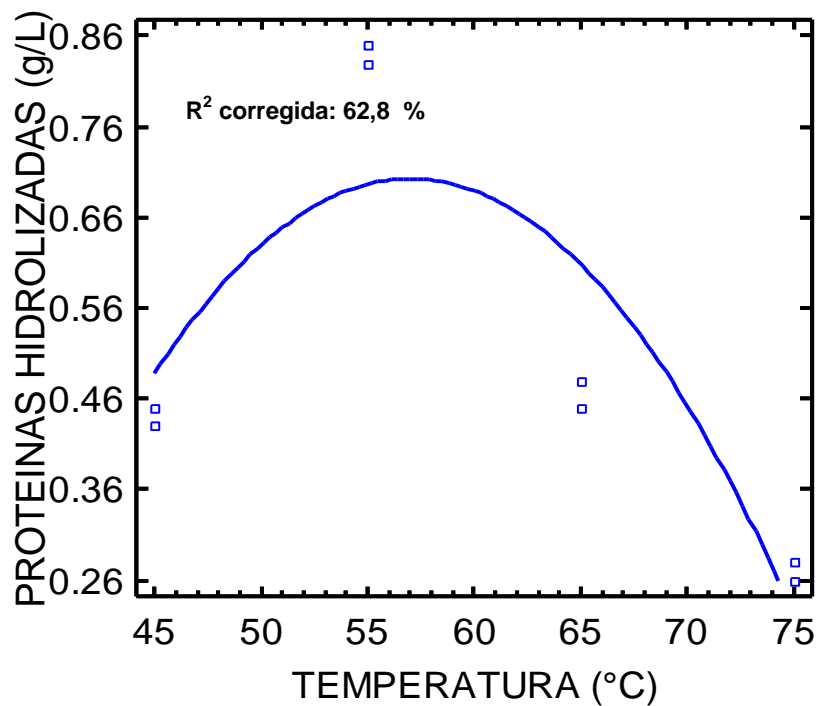


Figura 10: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la figura 10 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la concentración de proteínas hidrolizadas y la temperatura de hidrólisis. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = -4,13431 + 0,16965 \cdot \text{Temperatura} - 0,0014875 \cdot \text{Temperatura}^2$$

De la ecuación se obtuvo que la temperatura óptima estimada es de 57,0 °C y con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,7 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 62,8 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y la temperatura de reacción.

3.5 pH óptimo

Tabla 19: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 con el factor pH.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|----------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|---------|
| Tratamientos | 3 | 0,0661375 | 0,0220458 | 251,95 | 0,000 |
| Error | 4 | 0,0003500 | 0,0000875 | | |
| Total | 7 | 0,0664875 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 19 muestra el análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 con el factor pH, observando que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas hidrolizadas (g/L) y el pH de hidrólisis con un nivel de confianza del 95,0 %. Por lo tanto existe relación entre la temperatura y la concentración de y las proteínas hidrolizadas (g/L) debido a la

hidrólisis del extracto crudo proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1.

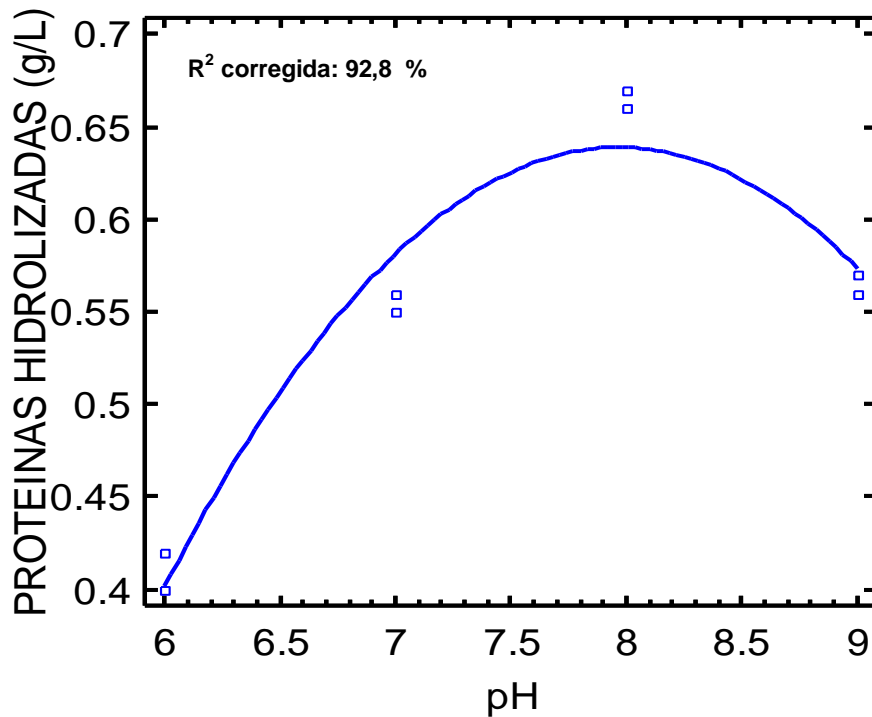


Figura 11: Gráfico que muestra el modelo ajustado de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el figura 11 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la concentración de proteínas hidrolizadas y el pH de hidrólisis. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = -3,25125 + 0,97625 \cdot \text{pH} - 0,06125 \cdot \text{pH}^2$$

De la ecuación se obtuvo que el pH óptimo estimado es de 8 y con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,63 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 92,8 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y el pH de hidrólisis.

Tabla 20: Análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas por el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-2 con el factor pH.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 3 | 0,297237 | 0,099079 | 317,05 | 0,000 |
| Error | 4 | 0,001250 | 0,000312 | | |
| Total | 7 | 0,298487 | | | |

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 20 muestra el análisis de varianza de la media de proteínas hidrolizadas con el factor pH, observando que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0,05 lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas hidrolizadas (g/L) y el pH de hidrólisis con un nivel de confianza del 95 %. Por lo tanto existe una relación entre la temperatura y la concentración de y las proteínas hidrolizadas (g/L) debido a la hidrólisis del extracto crudo proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2.

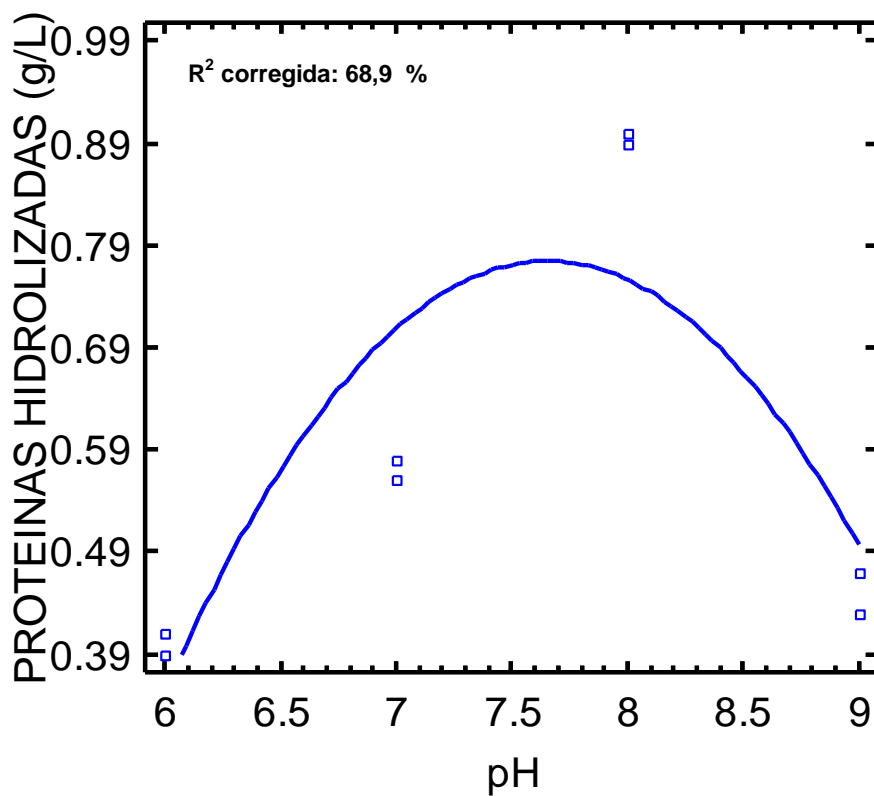


Figura 12: Gráfico que muestra el modelo de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la figura 12 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la concentración de proteínas hidrolizadas y el pH de hidrólisis. Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Proteínas hidrolizadas} = -8,23375 + 2,35375 \cdot \text{pH} - 0,15375 \cdot \text{pH}^2$$

De la ecuación se obtuvo que el pH óptimo estimado es de 7,65 y con una concentración de proteínas hidrolizadas de 0,775 g/L.

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 68,9 % de la variabilidad en la concentración de proteínas hidrolizadas y el pH de hidrólisis.

3.6 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S nos informa de la identidad de la bacteria depositada en la base de datos de Genbank de la búsqueda en Blast el cual indicó el porcentaje identidad de la secuencia bacteriana.

Tabla 21: Similitud de las secuencias de ARNr 16S para los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2.

| Cultivo bacteriano | Descripción | Identidad % | Especie | GenBank |
|---------------------------|---|--------------------|---|----------------|
| BP-1 | <i>Geobacillus</i> sp. NBRC 15313 secuencia parcial del gen ARNr 16S | 99 | <i>Geobacillus</i> sp. | AB680832.1 |
| BP-2 | <i>Bacillus licheniformis</i> strain AIS53 secuencia parcial del gen ARNr 16S | 99 | <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> . | GU967448.1 |

Fuente: Elaboración propia

IV. DISCUSIÓN

Aislamiento y screening de bacterias termófilas proteolíticas

Las muestras fueron tomadas a partir de ocho géiseres cuya temperatura varió entre 50 y 82 °C y un pH de 6,18 y 7,83. A partir de los cuales se seleccionaron dos cultivos bacterianos, los cuales fueron codificados como BP-1 y BP-2.

La formación del halo transparente alrededor de las colonias seleccionadas es resultante de la hidrólisis de la caseína, tomándose como evidencia de la actividad proteolítica en medio sólido (Habib *et al.*, 2012) a la temperatura de incubación de 50 y 60 °C, tal como se observa en la tabla 7 y 10. Lo que indicaría que los cultivos BP-1 y BP-2 tienen la capacidad de producir proteasas extracelulares en el medio agar leche descremada, ya que este es un medio complejo donde los nutrientes no se encuentran de manera libre, por lo que ambos cultivos produjeron esta enzima para obtener los nutrientes necesarios (García *et al.*, 1992).

Según la tabla 8 el valor P de del ANOVA para la variable halo de hidrólisis de los cultivos BP-1 y BP-2 es menor que 0,05 lo que indica que

existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro del halo de hidrólisis a 50 °C para ambos cultivos bacterianos. Siendo el cultivo BP-1 el que mostró un mayor diámetro de hidrólisis a esta temperatura mostrando un diámetro final de 45,8 mm a las 96 horas de incubación. Sin embargo en la tabla 11 se muestra el valor P también es menor que 0,05 indicando que también existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos cultivos, pero esta vez el cultivo BP-2 mostró un diámetro de hidrólisis mayor al cultivo BP-1 a la temperatura de 60 °C presentando un diámetro de 85,1 mm indicando que la temperatura está influenciando en la actividad enzimática en ambas bacterias.

Según Alquirica (2003) *A. niger* 2088 presentó un halo de 43 mm después de 6 días a 50 °C de incubación y *A. niger* ANH-15 presentó solo 15 mm, Sánchez *et al.* (2004) reportó la mayoría de bacterias marinas aisladas en su trabajo presentaron un halo aproximado a 15 mm después de 96 horas de incubación a 25 °C. Lo que indica que en el presente trabajo ambas bacterias mostraron un mayor diámetro de halo de hidrólisis que otras bacterias y hongos reportados.

Determinación del tiempo óptimo de la fermentación

El período de incubación juega un papel importante en producción enzimática. En el presente trabajo, la actividad máxima de la enzima en el medio líquido de caseína fue observada poco después de las 48 horas (Figura 7 y 8) de incubación al inicio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano como se muestra en las figuras 5 y 6. Observándose la degradación de proteínas desde la fase exponencial y a principios de la fase estacionaria. Estos resultados se ajustan con las observaciones hechas por Sevinc & Demirkan (2011) y Swamy *et al.* (2012) en donde la máxima actividad de la proteasa producida por *Bacillus sp.* y *Comomonas kerstersii* se produjo al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria. Sin embargo según Qadar *et al.* (2009) informó que *Bacillus subtilis* 3441 presentó una máxima actividad a las 72 horas. Ya que la producción de la enzima proteasa puede estar directamente vinculada con el metabolismo activo del cultivo bacteriano (Kanchana & Padmavathy, 2010). Sin embargo, Gupta *et al.* (2002) informaron de que la producción de proteasa extracelular está relacionada con la deficiencia de nutrientes al principio de la fase estacionaria.

Determinación de las condiciones óptimas del extracto crudo proteolítico

Actualmente, el uso de las enzimas está limitado por su termoestabilidad, sin embargo se ha demostrado que es posible producir enzimas termoestables a partir de microorganismos termófilos (Yano & Poulos, 2003).

La temperatura óptima de las proteasas termoestables está en un rango de 50 y 85 °C. Lo que concuerda con la temperatura óptima estimada para los extractos proteolíticos producidos por los cultivo BP1 y BP-2, los cuales mostraron una temperatura de 63,9 y 57 °C, respectivamente, como se observa en las figura 9 y 10, lo cual resulta coincidente con lo reportado en otras investigaciones donde se evaluaron otras proteasas bacterianas; siendo así que la temperatura óptima de la proteasa de *Bacillus sp.* PCSIR fue de 55 °C (Swamy *et al.*, 2012), una cepa de *Bacillus licheniformis* fue de 60 °C. (Olajuyigbe and Ajele, 2008) y una temperatura óptima entre 50 y 70 °C para una especie de *Geobacillus* (Hawumba *et al.*, 2002).

Debido a que las temperatura óptima para ambos extractos se encuentra en el rango de 45 y 65 °C ambas enzimas son consideradas termoestables (Demijaran *et al.*, 2001).

El pH óptimo de la mayoría de las proteasas termófilas se ha encontrado en el rango de 6,0 a 12,0. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en presente trabajo. En la Figuras 11 y 12 se puede observar que el pH óptimo estimado de reacción para el extracto proteolítico producido por el cultivo BP-1 y BP-2 es de 8 y 7,7 respectivamente lo que indica que pueden ser clasificadas como proteasas alcalinas (Rao *et al.*, 1998).

El pH óptimo de la enzimas obtenidas concuerda con lo reportado por varios autores; siendo el pH óptimo de la proteasa de *Bacillus licheniformis* USC 13 fue de 6 a 7,5 (Ageitos, 2011). *Geobacillus* sp. YMTC 1049 mostró una un pH óptimo para la actividad enzimática de 6.0–9.0 (Zhu *et al.*, 2007). Y 7,5 a 8,5 para una cepa *Bacillus stearothermophilus* TLS33 (Sookkheo *et al.*, 2003).

El pH óptimo es un parámetro que tiene gran relevancia para determinar el uso de la enzima, en este caso ambas proteasas tienen

gran importancia ya que las proteasas alcalinas ocupan el 25 % del mercado mundial de comercialización de enzimas (Rao *et al.*, 1998). Ya que las proteasas alcalinas bacterianas se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino (8 - 12), con la temperatura óptima entre 50 °C y 70 °C. Estas propiedades de las proteasas alcalinas bacterianas hacen adecuados para su uso en la industria (Jisha, 2013).

Identificación molecular de las bacterias termófilas proteolíticas aisladas

El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S y la comparación subsecuente con la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) a través del BLAST, permitieron ubicar a la BP-1 dentro de la familia *Bacillaceae* específicamente dentro del género *Geobacillus*; este cultivo presentó una similitud del 99 % con *Geobacillus* sp. NBRC 15313.

El género *Geobacillus* se caracteriza por ser células en forma de varilla que se producen solos o en cadenas cortas, móviles por medio de flagelos. La estructura de la pared celular es Gram-positivo, pero la reacción de tinción de Gram puede variar entre positiva y negativa. Presenta endosporas cilíndricas. Sus colonias de forma variable,

pigmentadas, pueden ser producidos en determinados medios de cultivo. El oxígeno aeróbico o anaeróbico facultativo (Zeigler, 2001), las cuales son características que presentó el cultivo BP-1 identificado como *Geobacillus* sp NBRC 15313.

Además gracias al análisis filogenético utilizando el secuenciamiento del gen ARNr 16S se han aislado diferentes especies del género *Geobacillus* a partir de aguas termales volcánicas. Por ejemplo, varias cepas de *Geobacillus thermoleovorans* se han aislado de la aguas termales volcánicas de Waimangu Volcanic Valley, Nueva Zelanda (Malhotra *et al.*, 2000; Noorwez *et al.* 2006). Obeidat *et al.* (2012) reportó el aislamiento de ocho especies de este género productores de proteasas a partir de cinco manantiales calientes de Jordania.

Y el análisis de la secuencia ARN 16S y la comparación subsecuente con la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) a través del BLAST, permitieron ubicar a la BP-2 dentro de la familia *Bacillaceae* específicamente dentro del género *Bacillus*; este cultivo presentó una similitud del 99 % con *Bacillus licheniformis*. Además las características fenotípicas reportadas por esta especie concuerdan con las características del cultivo BP-2, la cual posee

una pared celular Gram positiva para la reacción Gram, endosporas cilíndricas u ovas. Sus colonias de forma variable; de color blanquecino. El oxígeno aeróbico o anaeróbico facultativo (Garrity, 2004).

Se ha aislado a *Bacillus licheniformis* de diferentes fuentes termales. Según los trabajos realizados por Zilda *et al.* (2012) donde se aisló e identificó a esta especie partir de ambientes termales, Ghumr *et al.* (2012) reportó el aislamiento de una cepa termófila productora de proteasa identificada en base RNAr 16S como *Bacillus licheniformis* PB1. Siendo ya conocido que este género produce una amplia variedad de enzimas extracelulares, incluyendo proteasas.

V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron dos cultivos bacterianos productores de proteasas a partir de las aguas de los géiseres de Calientes, codificándose como cultivos BP-1 y BP-2.
2. Los dos cultivos bacterianos aislados mostraron actividad enzimática en medio sólido, observándose la hidrólisis de la caseína mediante la formación de halos transparentes. Siendo el cultivo BP-2 el que mostró un mayor diámetro del halo de hidrólisis a 50 °C a las 96 horas de incubación, presentando un halo de 45,8 mm. Y el cultivo BP-1 fue el que mostró un mayor diámetro del halo a 60 °C después de 96 horas de incubación, presentando un halo de hidrólisis de 85,3 mm.
3. El tiempo óptimo estimado de la fermentación de los cultivos bacterianos BP-1 y BP-2 para la máxima actividad enzimática fue a las 52,4 horas y las 50,6 horas respectivamente al finalizar la fase logarítmica de su crecimiento bacteriano.
4. La temperatura óptima estimado de los extractos proteolíticos crudos producidos por los cultivos BP-1 y BP-2 fue de 63,9 57 °C. y el pH

óptimo estimado fue de 8 y 7,65 para los cultivos BP-1 y BP-2 respectivamente.

5. El gen de ARNr 16S de los cultivos bacterianos fue secuenciado identificando molecularmente al cultivo BP-1 con un 99 % de similitud a la especie *Geobacillus* sp, mientras que el cultivo BP-2 presentó un 99 % de similitud correspondiente a la especie *Bacillus licheniformis*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar la purificación del extracto crudo obtenido mediante la precipitación con sulfato de amonio y cromatografía.
2. Realizar la optimización del extracto purificado para la obtención la máxima producción de enzimas.
3. Caracterizar el extracto enzimático purificado, determinando los parámetros cinéticos y evaluando además la sensibilidad de ciertos inhibidores.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ageitos Martínez, J.M.** (2011). Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis*. (Tesis doctoral). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Farmacia.
2. **Alain, K., Querellou, J., Lesongeur, F., Pignet ,P., Crassous, P., Raguénes, G., Cueff, V and Cambon-Bonavita, M.A.** (2002). *Caminibacter hydrogeniphilus* gen.nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogenoxidizing bacterium isolated from an East Pacificum Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1317-1323.
3. **Albers, S.V., Van de Vossenberg, J.L, Driessen, A.J and Konings, W.N.** (2000). Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. *Frontiers in Biociencia.* 1: 813-820.
4. **Almong O., González A., Klein D., Greenblatt H., Braun S. and Shoham G.** (2003). The 0.93 Å Crystal Structure of Sphericase: A

Calcium-loaded Serine Protease from *Bacillus sphaericus*. Journal of Molecular Biology. 332:1071-1082.

5. **Alquicira Páez, L.** (2003). Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína. (Tesis de especialización). Universidad Autónoma Metropolitana.
6. **Amend, J.P and Shock, E.** (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. FEMS Microbiology Reviews 25.
7. **Aqel, H., Al-Quadán, F., Yousef, T.** (2012). A novel neutral protease from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62. J. BioSci. Biotech. 1(2): 117-123.
8. **Becker P.** (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 in olive oil. Application in Microbiol and Biotechnology. 48: 184-190.
9. **Bouzas, T., Barros, J and Gonzales, T.** (2006). Villa Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. Protein and Peptide Letter. 13, 645-651.

10. **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
11. **Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M., and Flint S.H.** (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1012-1018.
12. **Canganella, F and Wiegel, J.** (2014). Anaerobic thermophiles. *Life*. 4, 77-104. ISSN 2075-1729. USA.
13. **Castillo, F., Roldan, M.D., Huertas, M.J., Caballero, F., Moreno, C., y Luque, L.R.** (2005). *Biotechnology ambiental*. Madrid: Tébar SL. 380-386.
14. **Chandra, M., Behera, A.K., Kulshreshtha, N.M., Mahmooduzafar, K.** (2013) Extreme DB: A Unified Web Repository of Extremophilic Archaea and Bacteria. *PLoS ONE* 8(5): e63083.
15. **Chung, A. P., Rainey, F.A., Valente, M., Nobre, M. F and Da Costa, M. S.** (2000). *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 209-217.

16. **Cruz, V., Vargas, V. and Matsuda, K.** (2010). Geochemical Characterization of Thermal Waters in the Calientes Geothermal Field, Tacna, South of Peru. Proceedings World Geothermal Congress. Bali, Indonesia.
17. **Demijaran D., V. Morris, F. Cassidy.** 2001. Enzymes from extremophiles. Current Opinion Chemical. 5: 144-150.
18. **Eichler, J.** (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnology Advances 19: 261–278. Israel.
19. **Forbes, B.A., Sahm, D y Weissfeld, A.** (2009). Diagnóstico Microbiológico. (12 Ed.) Argentina: Ed. Médica Panamericana.
20. **García, R., Cocha, J.M., Ramírez, P. y Contreras, G.** (1992). Perfil de exoenzimas de *Pseudomonas aeruginosa*. Reuniones científicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
21. **Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T.G.** (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Ed. Springer.

22. **Ghumr, P., Shafique, M., Ishtiaq, M., Javed, I., Ahmad, B., Jamal, J., and Hameed, A.** (2012). Isolation and screening of protease producing thermophilic *Bacillus* strains from different soil types of Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*. 6(8): 1663-1668.
23. **Gomes, J and Steiner, W.** (2004). Extremophiles and Extremozymes, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 223–235.
24. **Gómez, P y Pérez, M.** (2007). Archaeobacterias hipertermófilas: vida en ebullición. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias RCCV*. 1 (2). 560-569.
25. **Gupta, R., Beg, Q.K and Lorenz, P.** (2002): Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *App. Microbiol. Biotech.* 59:15-32.
26. **Habib, S.M., Fakhruddin, A.N., Begum, S and Ahmed, M.** (2012). Isolation and screening of thermostable extracellular alkaline protease producing bacteria from tannery effluents. *J. Sci. Res.* 4 (2): 515-522.
27. **Haki, G and Rakshit, S.** 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17-34.

28. **Hawumba, J.F., Theron, J., Brözel, V.** (2002). Thermophilic Protease-Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. *Current Microbiology*. Vol. 45, 2: 144- 150.
29. **Horikoshi, K. (1999).** *Microbiol Molecul Biol Reviews*, 63: 735-750.
30. **Jaenicke R.** (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*. 202:715-728.
31. **Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.M., Sajith, S., Priji, P., Moolakkariyil, S.J and Sailas, B.** (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research journal*: 1 (3): 39-51 India.
32. **Kanchana, M. and Padmavathy, S.** (2010). Optimization of extracellular alkaline protease enzyme from *Bacillus* sp. *The Bioscan*, 5(1): 85 – 87.
33. **Kikani, B.A., Shukla, R.J and Singh, S.P.** (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Rajkot-360 005, India*.

34. **Kumar, S. and Nussinov, R.** (2001). How do thermophilic proteins deal with heat?. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 1216–1233.
35. **Lata, C., Negi, D.S and Mehrotra, V.** (2014). Potential of microbial proteases. *Indian Streams Research Journal*. Vol 4.
36. **MacFadin.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (2009). (3 Ed.). Argentina. Ed. Panamericana.
37. **Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J.** (2009). Brock, *Biología de los microorganismos*. (12^a ed.). Madrid: Pearson Education.
38. **Madigan, M.** (2005). Brock Biology of Microorganisms. (Ed). 11th Ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
39. **Malhotra, R., Noorwez, S.M., Satyanarayana, T.** (2000). *Lett Appl Microbiol* 31:378–384
40. **Marteinsson, V.T., Sigurbjorg, H and Cédric, F.** (2001). Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:9: 4242-4248.

41. **McCall, G. J. H.** (2005). Geysers and hot springs. Elsevier Ltd. 105 – 117.
42. **Mose, R., Ciaramella, M., Cannio, R., Pisani, F., Moracci, M and Bartolucci, S.** (2002). Extremophiles 2002. Journal of Bacteriology. 185 (13): 3683–3689.
43. **Noorwez, S.M., Ezhilvannan, M., Satyanarayana, T.** (2006) Indian J Biotechnol 5:337–345.
44. **Obeidat, M., Khyami, Adeb., Al-Zoubi and Otri.** (2012). Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. African Journal of biotechnology. 11(25): 6763-6768.
45. **Olajuyigbe, F.M., Ajele, T.O.** (2005). Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. Afr. J. Biotechnol., 4(8): 776-779.
46. **Ollivier, B., Patel, B.K., and García, J.L.** (2000). Anaerobes from extreme environments. Journal Seckbach. (ed). 73-90.

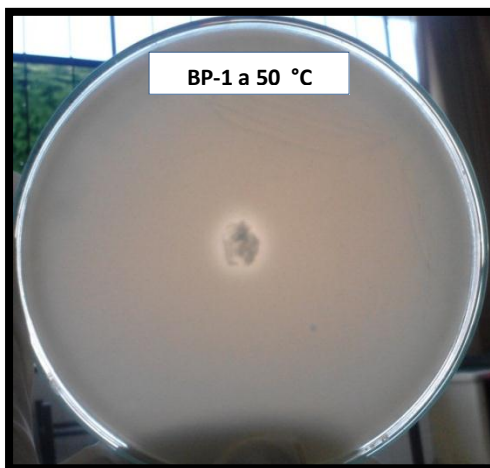
47. **Qadar S.A., Erum, S., Samina, L., Abida, A.** (2009). Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Indian J. Biotechnol* 8: 286-290.
48. **Rao M. B., M. T. Aparna, S. G. Monhini y V. V. Deshpande.** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: 597-635.
49. **Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V and Evilia, C.** (2013). Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. Hindawi Publishing Corporation Vol 2013 pp 1-14, USA. Article ID 373275.
50. **Remigio, Z., W, Muronde., O, Holst and W, Parawira.** (2012). Isolation and characterization of a protease-producing thermophilic bacterium from an African hot spring. *African Journal of Biotechnology* .11(62): 12571-12578.
51. **Reysenbach, A. L., Götz, D., Yernool, D.** (2002). Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs. *Biodiversity of microbial life: foundation of earth's biosphere.* 345-421. New York.
52. **Ríos, C.** (2012). *Estadística y diseño experimental.* Perú. Universitaria.

53. **Sánchez, T., Leon, J., Woolcott, J y Arauc, K.** (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *peru. biol.* 11(2): 179-186.
54. **Sevinc, N and Demirkan, E.** (2011) Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. *J. Biol. Environ. SCI.*, 5(14), 95-103
55. **Sievert, S.M. and Kuever, J.** (2000). *Desulfacinum hydrothermale* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1239-1246.
56. **Sokolova, T., Gonzalez, J. M., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Tourova, T. P., Kato, C., Bonch-Osmolovskaya, E. A. and Robb, F. T.** (2001). *Carboxidobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 141-149.
57. **Sookkheo B, Sinchaikul S, Phutrakul S, Chen S.** (2000). Protein Expr Purif. 20:142–151.

58. **Swamy, k., Kashyap,S., Vijay, R., Tiwari, R and Anuradha, M.** (2012). Production and optimization of extra cellular protease from *bacillus* sp. isolated from soil. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. 3 (2): 564-569.
59. **Yano J. K. y T. L. Poulos.** New Understandings of thermostable and peozostable enzymes. Current Opinion in Biotechnology. 14: 360-365.
60. **Zeigler, D.R.** (2001). The Genus *Geobacillus* .7th Edition, Vol 3.
61. **Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q and Shen, P.** (2007) Enzyme Microb Technol 40:1592–1597.
62. **Zilda, D.S., Harmayani, E., Widada, J, Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, H and Fawzya, Y.N.** (2012). Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from indonesian hotspring. Squalen. 7(3): 105-114.

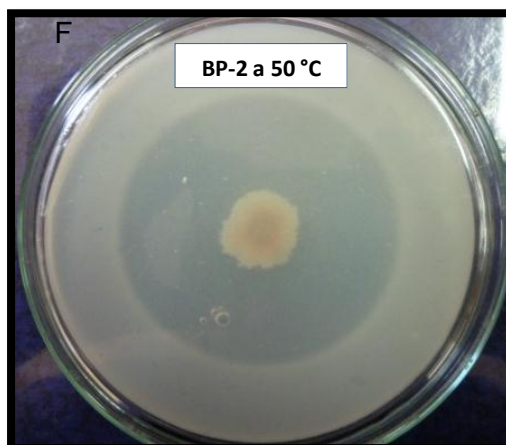
VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Actividad enzimática en medio sólido a 50 °C después de 96 horas de incubación



ANEXO 1.1: Fotografía que muestra el halo de hidrólisis producido por el cultivo bacteriano BP-1 50 °C.

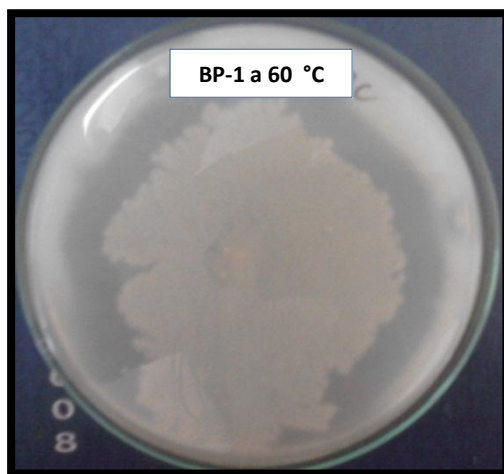
Fuente: Elaboracion propia



ANEXO 1.2: Fotografía que muestra el halo de hidrólisis producido por el cultivo bacteriano BP-2 a 50 °C.

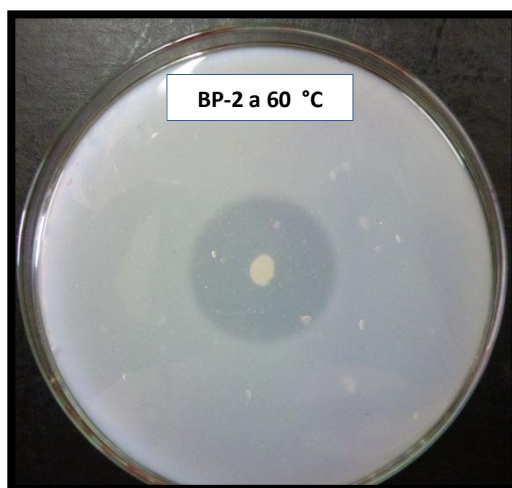
Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 2: Actividad enzimática en medio sólido a 60 °C después de 96 horas de incubación



ANEXO 2.1: Fotografía que muestra el halo de hidrólisis producido por el cultivo bacteriano BP-1 60 °C.

Fuente: Elaboracion propia



ANEXO 2.2: Fotografía que muestra el halo de hidrólisis producido por el cultivo bacteriano BP-2 a 60 °C.

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 3: Análisis estadístico de la actividad enzimática en medio sólido.

ANEXO 3.1: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis de la regresión polinomial Proteínas hidrolizadas versus Tiempo de fermentación del cultivo bacteriano BP-1 a 60 °C aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor-P |
|------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -0.0296429 | 0.0531483 | -0.557739 | 0.5882 |
| Tiempo | 0.0590923 | 0.0034574 | 17.0915 | 0.0000 |
| Tiempo^2 | -0.00056423 | 0.000046135 | -12.2299 | 0.0000 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 3.2: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor P |
|------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -3.70944 | 0.632988 | -5.8602 | 0.002 |
| Temperatura | 0.13585 | 0.0216536 | 6.27377 | 0.001 |
| Temperatura^2 | -0.001062 | 0.00017994 | -5.90449 | 0.002 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 4: Análisis estadístico de la actividad enzimática en medio líquido.

ANEXO 4.1: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor P |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -4.13431 | 1.6893 | -2.44735 | 0.0581 |
| Temperatura | 0.16965 | 0.0577888 | 2.93569 | 0.0324 |
| Temperatura ² | -0.0014875 | 0.00048024 | -3.0974 | 0.0269 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 4.2: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis Proteínas hidrolizadas versus temperatura del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor P |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -4.13431 | 1.6893 | -2.44735 | 0.0581 |
| Temperatura | 0.16965 | 0.0577888 | 2.93569 | 0.0324 |
| Temperatura ² | -0.0014875 | 0.00048024 | -3.0974 | 0.0269 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 5: Análisis estadístico de la actividad enzimática en medio sólido

ANEXO 5.1: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-1 aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor P |
|------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -3.77125 | 1.59828 | -2.35957 | 0.0648 |
| pH | 1.21825 | 0.433386 | 2.81101 | 0.0375 |
| pH ² | -0.08625 | 0.0288412 | -2.99052 | 0.0304 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 5.2: Análisis de varianza de la prueba de hipótesis Proteínas hidrolizadas versus pH del extracto proteolítico producido por el cultivo bacteriano BP-2 aislado de Géiseres de Calientes.

| Parámetro | Estimado | Error Estándar | Estadístico T | Valor P |
|------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Constante | -8.23375 | 2.58167 | -3.18931 | 0.0243 |
| pH | 2.35375 | 0.70004 | 3.36231 | 0.0201 |
| pH ² | -0.15375 | 0.0465866 | -3.3003 | 0.0215 |

Fuente: Elaboracion propia

ANEXO 6: Determinación de la curva patrón

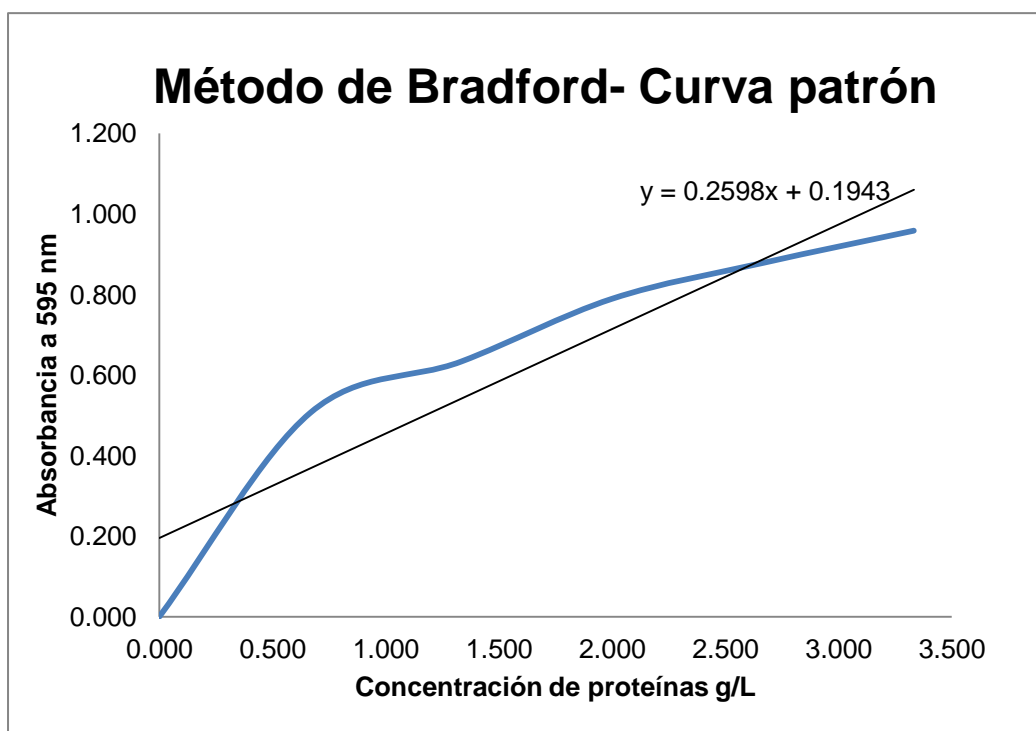
Se determinó en primer lugar la curva patrón para la determinación de proteínas empleando el método Bradford. Esto se hizo considerando el siguiente cuadro:

| Agregados | Tubos de prueba | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| BSA (0,5 µg/µL | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 125 |
| Agua destilada µL | 500 | 475 | 450 | 425 | 400 | 375 |
| Bradford µL | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Absorbancia 595 nm | 0,000 | 0,206 | 0,633 | 0,789 | 0,878 | 0,958 |

Fuente: Elaboracion propia

Las absorbancia obtenida para cada tubo de prueba se relacionó con su correspondiente concentración de proteínas evaluada en un gráfico que sirvió para determinar la recta y su ecuación de la curva patrón de determinación la concentración de proteínas.

ANEXO 7: Método de Bradford-CURVA PATRÓN



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 8: Extracción del ADN genómico

El ADN genómico se extrajo a partir de 1mL del cultivo bacteriano puro el que se centrifugó a 16.000 x g por 2 min, obteniéndose un sedimento bacteriano. Una vez removido el sobrenadante, este sedimento fue resuspendido en 480 μ L de EDTA 50 mM con 120 μ L de lisozima (10 mg/mL), mezclándose lentamente, para luego colocarla a incubar a 37 °C por 60 min.

Luego la mezcla se centrifugó por 2 min a 16.000 x g y se removió el sobrenadante. El propósito de este tratamiento previo es debilitar la pared celular para una lisis eficiente.

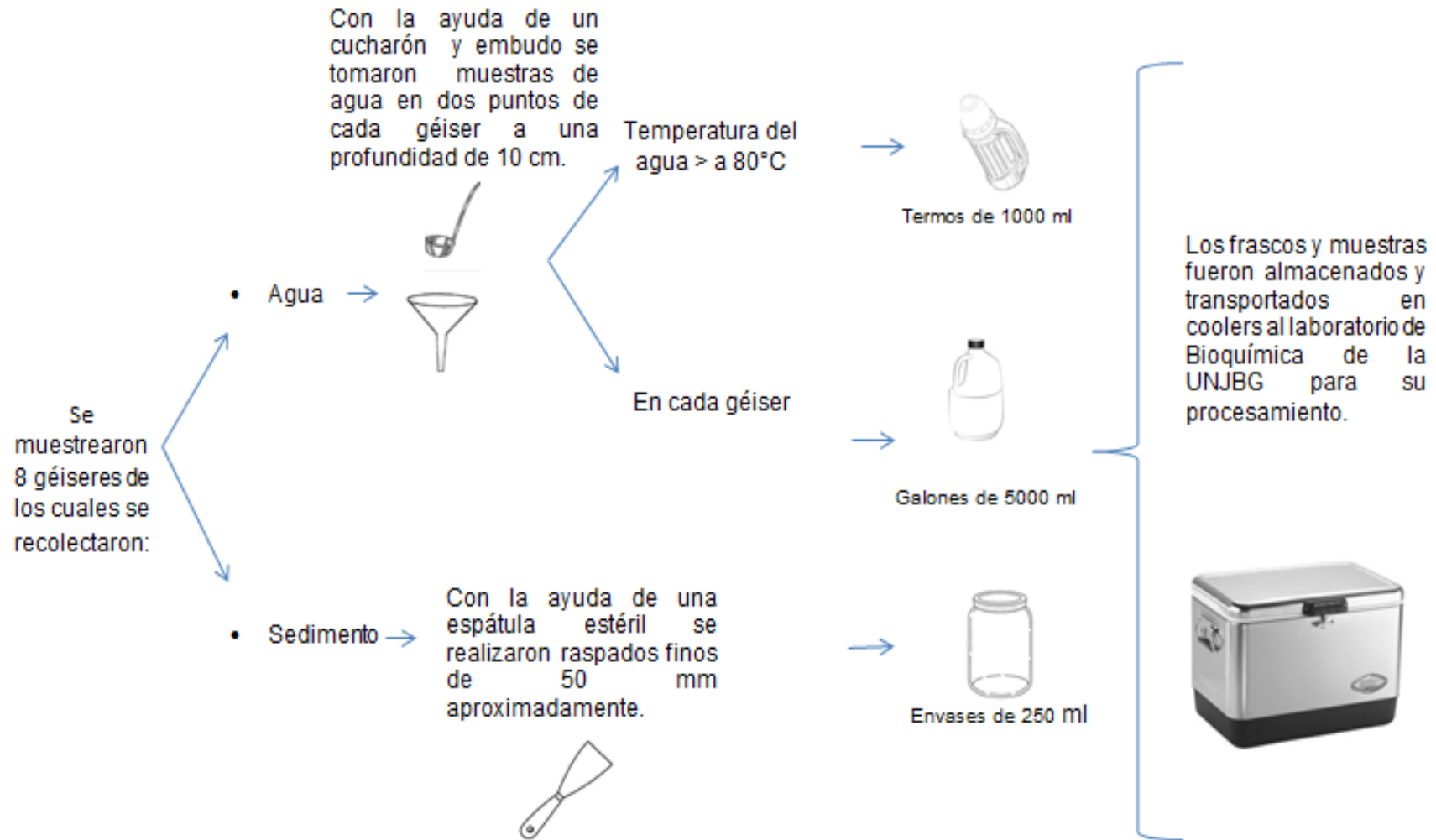
Para la lisis bacteriana, el sedimento resultante fue resuspendido suavemente en 600 μ L de solución de lisis, para luego incubar a 80 °C por 5 min. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 3 μ L de la solución RNAasa, invirtiendo el tubo 2-5 veces para mezclar y se incubó a 37 °C por 60 min y se enfrió la muestra a temperatura ambiente. El lisado celular obtenido fue incubado con 200 μ L de la solución de precipitación de proteínas mezclado en vórtex por 20s e incubando la muestra en hielo por 5 min, para luego centrifugar a 16.000 x g por 3 min. El sobrenadante que contenía el ADN se transfirió a un tubo microcentrífuga limpio de 1,5 mL y se agregó 600 μ L de isopropanol a

temperatura ambiente para precipitar el ADN, se mezcló lentamente invirtiendo el tubo hasta observar filamentos de ADN y se centrifugó a 16.000 x g por 2 min. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se secó el tubo en papel absorbente limpio. Una vez seco el pellet de ADN, éste se lavó con 600 µL de etanol al 70 % a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo suavemente varias veces, posteriormente centrifugar 16.000 x g por 2 min y descartar el sobrenadante. El sedimento de ADN se secó al aire por 15 min.

Al observar el sedimento de ADN seco, se rehidrató agregando 100 µL de la solución de rehidratación al tubo, incubando durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.

Finalmente, el ADN resuspendido se almacenó a 4 °C.

Anexo 9: Metodología de muestreo de muestras de agua y sedimento.



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 10: Secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de los cultivos bacterianos aislados

ANEXO 10.1 *Geobacillus* sp. Strain NBRC 15313

>gi|359803883|dbj|AB680832.1| *Geobacillus* sp. NBRC 15313 gene for 16S rRNA, partial sequence

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAATC
GGAGCTTGCTCTGATTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGG
ATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGCTGT
CACTTGCGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGC
CTTCGGGTTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTCAAG
AGGGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCCTTTAGTGCTGCAGCTAAC
GCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGA

TTGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTCGCCTCTAGTTGCCAGCACGAAGGTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCG
GCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAAC
CCGCGAGGGGGAGCGAATCCCCAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGG
CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
CGAGAGCTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCTTACGGGAGCCAG
CCGCCGAAGGTGGGGCAAGTGATTGGGGTGAAG

ANEXO 10.2: *Bacillus licheniformis* strain AIS53

>gi|295083281|gb|GU967448.1| *Bacillus*
licheniformis strain AIS53 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

AGAGTTTGATCNTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG
CAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAA
AAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTRCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCC
TTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCC
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTC

TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAAC
AAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC
TTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
ASESOR



Ana Julissa Naquiche Calero
TESISTA