

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE CEPAS DE *Bacillus cereus* PREVIAMENTE AISLADAS DE ALIMENTOS

## DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Bacillus cereus* STRAINS PREVIOUSLY ISOLATED FROM FOODS

Valentina Arroyave Ospina\*, Sara Vélez Bravo\*, Laura Margarita Castañeda S\*,  
Jennifer Alexandra Sánchez C\*.

---

### RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus* representan una fuente importante de enzimas ampliamente utilizadas en la industria, uno de estos casos es el de las enzimas de tipo proteasa que actúan rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas, liberando los aminoácidos y teniendo así una amplia gama de aplicaciones en procesos como la fabricación de detergentes, medicamentos, cosméticos, alimentos y en la industria avícola, papelería y textil. Dentro de las bacterias de tipo bacilos Gram positivos y esporulados, *Bacillus cereus* tiene la capacidad de producir altos rendimientos de enzimas proteolíticas neutras y alcalinas con propiedades importantes como alta estabilidad frente a temperaturas extremas, pH variable, disolventes orgánicos, detergentes y compuestos oxidantes. Dado que *B. cereus* produce una amplia variedad de proteasas, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad proteolítica de cepas de *B. cereus* aisladas previamente de alimentos y seleccionar aquellas que presentan una alta actividad proteolítica. Se evaluaron 207 cepas de *B. cereus* en medio agar caseína y posterior a 48 horas de incubación a 37°C se valoró la actividad proteolítica mediante la medición del halo de degradación en el medio. La cepa de referencia *B. cereus* NVH 1257 fue utilizada como control de la actividad proteolítica. De las 207 cepas analizadas, 6 presentaron una actividad proteolítica superior a la cepa control, por lo que estas cepas podrían tener un alto potencial biotecnológico.

**Palabras clave:** Actividad proteolítica, *Bacillus cereus*, Caseína, Enzimas microbianas, Proteasas.

## ABSTRACT

Bacteria of *Bacillus* genus represent an important source of enzymes widely used in the industry, one of these cases is protease-type enzymes that act by breaking the peptide bonds of proteins, releasing amino acids and having a wide range of applications in processes as manufacturing of detergents, medicines, cosmetics, food and in the poultry, paper and textile industries. Within the Gram-positive and sporulated bacilli, *Bacillus cereus* can produce high yields of neutral and alkaline proteolytic enzymes with important properties such as high stability against extreme temperatures, variable pH, organic solvents, detergents, and oxidizing compounds. Since *B. cereus* produces a wide variety of proteases, the aim of this study was to evaluate the proteolytic activity of *B. cereus* strains previously isolated from food and to select those with high proteolytic activity. 207 *B. cereus* strains were evaluated in casein agar medium and after 48 hours the proteolytic activity was assessed by measuring degradation halo in the medium. The reference strain *B. cereus* NVH 1257 was used as control for proteolytic activity. Finally, it was found that of 207 strains, 6 of them presented a higher proteolytic activity than the control strain, whereby these strains could have a high biotechnological potential.

**Key words:** Alkaline protease. *Bacillus cereus*. Casein. Microbial enzymes. Proteolytic activity.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas de tipo proteasa son metabolitos primarios que se encuentran dentro del grupo de las hidrolasas debido a que catalizan la escisión de enlaces covalentes utilizando agua, generalmente, se les denomina enzimas hidrolíticas desempeñando un importante papel en la proteólisis por lo que se les llaman enzimas proteolíticas [1]. Las proteasas se clasifican como ácidas, neutras y alcalinas dependiendo del rango de pH óptimo en el cual actúan, además, dependiendo del sitio de acción pueden clasificarse como exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas rompen el péptido cerca de los grupos terminales del sustrato, mientras que las

endopeptidasas lo hacen lejos de los grupos terminales. Estas últimas, de acuerdo con sus grupos funcionales son clasificadas en cuatro grupos: serinproteasas, proteasas aspárticas, cistein proteasas y metaloproteasas [2].

Las proteasas son una de las familias de enzimas ampliamente utilizadas en la industria, y por tanto una de las más comercializadas. Hoy en día, las enzimas de tipo proteasa representan aproximadamente el 65% del mercado mundial de las enzimas debido a su amplia variedad de aplicaciones, por lo que son utilizadas en diferentes industrias, entre las que se destacan la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y textil. Así mismo, las proteasas han sido utilizadas en la elaboración de detergentes y en procesos de biorremediación [2].

Las ventas mundiales de enzimas industriales se estimaron en un valor aproximado de 4.200 millones de dólares para el año 2016, donde se proyectó que las proteasas podrían llegar a un mercado global de aproximadamente 2.210 millones en términos de valor para 2021 a una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 6 % de 2016 a 2021. De todas las proteasas producidas, las proteasas de origen microbiano representan la mayor participación en el mercado, seguidas por la fuente animal y vegetal. Esto se debe a que las proteasas de origen microbiano poseen grandes ventajas como su producción a nivel biotecnológico, estabilidad frente a fluctuaciones de pH y temperatura, diversidad bioquímica, fácil manipulación a nivel genético y bajos costos de producción [2, 3].

Diversas especies pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizan por ser importantes fuentes de proteasas microbianas, ya que sintetizan y secretan enzimas proteolíticas durante su crecimiento siendo estos metabolitos primarios producidos en gran cantidad, lo cual es debido a su metabolismo, el cual se adapta a condiciones poco favorables como la falta de nutrientes mediante la excreción de enzimas hidrolíticas o la producción de endosporas [4]. La máxima síntesis de estas enzimas extracelulares se da al final de la fase exponencial y previo a la fase de la esporulación, en donde generalmente la fuente de carbono en el medio se ha agotado y estos cambios en las condiciones de cultivo activan genes sujetos a la represión catabólica [4]. Se ha descrito que las cepas de *Bacillus* producen

proteasas extracelulares de tipo serin proteasas y metaloproteasas. Estas se distinguen entre sí por la estructura de sus centros activos. Las serinproteasas se caracterizan por ser alcalinas y tener en su centro activo una serina e hidrolizar ésteres terminales simples mientras que las metaloproteasas son proteasas neutras, poseen en su sitio activo cinc y son endoenzimas que hidrolizan preferentemente uniones con el grupo amino de la leucina o fenilalanina [1,3].

El género *Bacillus* incluye más de 200 especies y comprende el grupo más grande de bacterias Gram positivas formadoras de esporas, las cuales son aerobias o anaerobias facultativas y móviles. Además, constituye uno de los géneros más comunes de vida libre presentes en el suelo, siendo este considerado su hábitat primario; sin embargo, también se encuentran presentes en ríos, agua de mar y algunos alimentos. Debido a que este género es ubicuo en el ambiente y gracias a su potencial de producir endosporas, son fácilmente aislados, cultivados y conservados en el laboratorio [2,5,6].

En los últimos años se han desarrollado metodologías para mejorar la producción de enzimas de origen microbiano a nivel industrial, ya que en el caso específico de las proteasas surge la necesidad de proteasas más eficientes, que exhiban una actividad óptima a pH mayores a 10, temperaturas mayores a 50°C, resistan solventes orgánicos, puesto que la mayoría de los procesos industriales se llevan a cabo en condiciones extremas de pH, temperatura y/o altas concentraciones de solventes orgánicos, condiciones en las cuales muchas enzimas carecen de actividad biológica [3].

Debido al alto impacto económico y a que *Bacillus sp.* es empleado como modelo productor por diferentes proveedores mundiales de proteasas gracias a sus cualidades metabólicas, se han incrementado los estudios en busca de nuevas cepas de diversos ambientes y que posean alta actividad proteolítica, además de metodologías para mejorar la producción de estas, aumentando el rendimiento a un menor costo [7,8]. La ingeniería de proteínas se ha utilizado para manipular la secuencia de los genes y poder desarrollar proteasas que tengan una especificidad única y una estabilidad mejorada. Este tipo de estudios también ayuda en la comprensión de las relaciones estructura-función de las enzimas. Pero la

investigación de la inmensa diversidad microbiana para dirigirse a los productores de nuevas proteasas con características industrialmente deseables todavía constituye un importante área de investigación [3].

Por lo anterior, la identificación de nuevas cepas con alta actividad proteasa constituye el primer paso que permite la búsqueda de genes que codifican proteasas y posteriormente llevarlos a sistemas de expresión de proteínas, para valorar las características de dichas proteasas y analizar si es factible su utilización en la industria. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad proteolítica de diferentes cepas de *Bacillus cereus* aisladas previamente de alimentos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Medios de cultivo**

El caldo Luria-Bertani suplementado con ampicilina fue utilizado para activar las cepas previamente criopreservadas y para el crecimiento de las cepas de *B. cereus*. La determinación de la actividad proteolítica se realizó en agar caseína constituido por leche en polvo deslactosada 50 g/L, caseína 5 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, glucosa 1 g/L y agar bacteriológico 12,5 g/L, el pH final fue ajustado a 6,8.

### **2.2 Activación de cepas de referencia de *B. cereus***

Se evaluaron las cepas de referencia *B. cereus* NVH 1257, NVH 1230, ATCC 14579 y ATCC 27348. Estas cepas se encontraban conservadas en filtros, por lo cual, para liberar las esporas del filtro, cada filtro se introdujo a un tubo que contenía 1 mL de agua destilada estéril y se agitó en vortex de forma vigorosa por 5 min. Se inocularon 200 µL en 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 20 h.

### **2.3 Estandarización de condiciones óptimas para el crecimiento y determinación de la actividad proteolítica de *B. cereus* en agar caseína**

#### **2.3.1 Crecimiento de las cepas de *B. cereus* en medio LB**

Se evaluó el crecimiento en caldo LB de las cepas de referencia de *B. cereus*; para esto, al finalizar el tiempo incubación de 20 h se midió mediante espectrofotometría la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Posteriormente, se transfirió un volumen entre 300 y 500  $\mu$ L del cultivo a un nuevo tubo que contenía 5 mL de caldo LB+Amp y se garantizó que este iniciaría en una DO de 0,1 a 600 nm. Finalmente, las cepas se incubaron a 37°C y 180 rpm y se realizó un seguimiento a la absorbancia cada hora hasta que los cultivos alcanzaran una DO de 0,6 a la misma longitud de onda.

**2.3.2 Determinación de la actividad proteolítica de cepas de referencia de *B. cereus***  
Con el cultivo a una DO de 0,6, se utilizó un volumen de 5  $\mu$ L y 10  $\mu$ L para ser sembrado por la técnica de microgota en agar caseína. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 24, 48 y 72 h de incubación. Para estandarizar esta metodología se evaluaron 4 cepas de referencia (NVH 1257, NVH 1230, ATCC 14579 y ATCC 27348) cada una por duplicado. Finalmente, los halos de degradación fueron medidos en todas las placas.

#### **2.4 Activación de 207 cepas crioconservadas de *B. cereus***

Las diferentes cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos se encontraban crioconservadas en medio LB suplementado con glicerol y ampicilina. Para su activación, se inoculó 200  $\mu$ L de cada una de las cepas en 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina, posteriormente se incubaron a 37 °C y 180 rpm de agitación por 20 h.

#### **2.5 Verificación de cultivos de *B. cereus* por tinción de Gram**

La pureza de los cultivos provenientes de las cepas de *B. cereus* crioconservadas se verificó en microscopio óptico mediante tinción de Gram, con el fin de verificar la ausencia de posibles contaminaciones que se hayan presentado antes, durante o después del almacenamiento de las cepas.

#### **2.6 Determinación de la actividad proteolítica**

La actividad proteolítica de cada una de las 207 cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos fue evaluada en medio sólido agar caseína de acuerdo con la metodología previamente estandarizada con las cepas de referencia de *B. cereus*.

Todos los cultivos después de activados se llevaron a una DO de 0.6 a 600 nm, para asegurar una cantidad de biomasa igual para todas las cepas, a partir del cual se inoculó un volumen de 5  $\mu$ L en agar caseína, y se incubó a 35°C durante 48 h, el procedimiento anterior se realizó por duplicado para confirmar el tamaño del halo de hidrólisis formado, reportando el tamaño del diámetro en milímetros y registrando el promedio de los halos obtenidos para cada cepa [3,10].

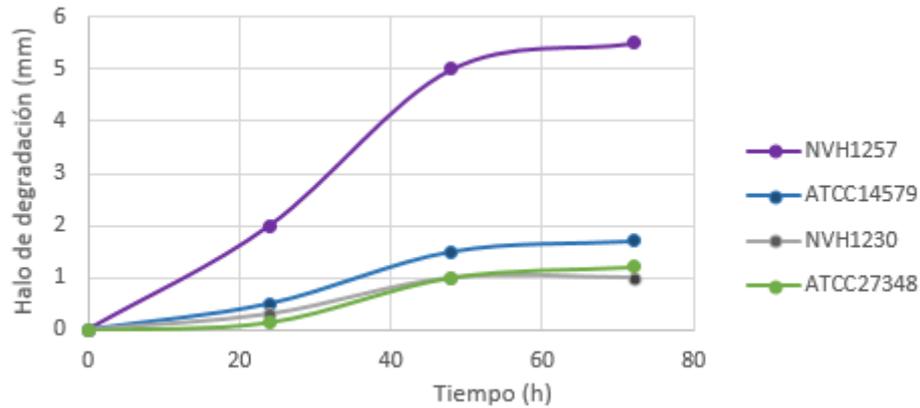
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Estandarización de condiciones óptimas para el crecimiento y determinación de la actividad proteolítica de *B. cereus* en agar caseína**

Se seleccionó un volumen de siembra en agar caseína de 5  $\mu$ L ya que mediante la técnica de microgota con dicho volumen se podía observar un halo de degradación más claro y simétrico en comparación con el volumen de 10  $\mu$ L donde en muchas ocasiones el crecimiento del microorganismo impedía una correcta visualización y adecuada medida de los halos de degradación.

En cuanto al tiempo de incubación para evaluar la actividad proteolítica, se observó en las 4 cepas de referencia evaluadas que a las 24 horas aún no se obtenía un buen halo de hidrólisis de la caseína en comparación a la medida realizada a las 48 horas como se observa en la Figura 2.

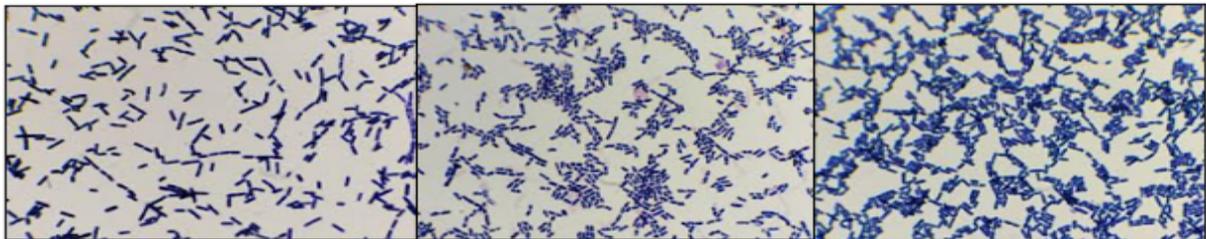
A las 72 horas, la degradación de la caseína no aumentaba significativamente siendo innecesario aumentar el tiempo de incubación por lo que se seleccionó un tiempo de incubación de 48 horas para realizar la medición de los halos de degradación.



**Figura 2. Halo de degradación de las cepas de referencia en agar caseína evaluado a diferentes horas.**

### 3.2 Verificación de pureza de los cultivos de *B. cereus* por tinción de Gram

Debido a que las cepas de *B. cereus* se encontraban crioconservadas por largos periodos de tiempo, se verificó la pureza de los cultivos con el fin de garantizar la ausencia de otras bacterias, correspondiendo a bacilos Gram positivos con extremos rectos y un típico crecimiento en cadenas. En la Figura 3 se muestran las tinciones de Gram obtenidas de algunas de las 207 cepas evaluadas.



**Figura 3. Tinción de Gram**

### 3.3 Evaluación de la actividad proteolítica de cepas de *B. cereus*

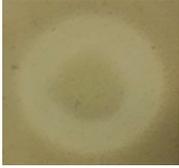
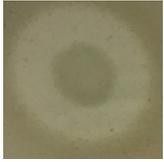
De las cuatro cepas de referencia utilizadas para la evaluación de la actividad proteolítica, la cepa *B. cereus* NVH 1257 fue la que presentó el mayor halo de degradación de la caseína siendo de 5 mm, por lo cual esta cepa fue utilizada como control. Se evaluó la actividad proteolítica de 207 cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos en medio agar caseína de acuerdo con la metodología previamente estandarizada. Del total de cepas evaluadas, seis cepas (2,9%) presentaron un halo de degradación de caseína mayor que la cepa control, por lo cual estas fueron seleccionadas como las cepas con mayor actividad proteolítica. De estas 6 cepas,

específicamente la cepa de *B. cereus* 154 exhibió el halo de degradación más grande entre todas las cepas evaluadas, siendo de 6,25 mm. Del total de las cepas, cuatro presentaron un halo de degradación de la caseína de 5 mm, al igual que la cepa control, y las restantes 197 cepas presentaron un halo de degradación menor a 5 mm (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Resultados de la actividad proteolítica de 207 cepas de <i>B. cereus</i> en agar caseína.</b>		
<b>Relación respecto al control</b>	<b>Número de cepas</b>	<b>Rango de halo de hidrólisis (mm)</b>
Mayor	6	5,25 - 6,25
Igual	4	5
Menor	197	1 - 4,5

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para las cepas de referencia de *B. cereus* utilizadas con su respectivo halo de degradación en milímetros y una imagen del halo de degradación. También se presentaron los datos para las cepas aisladas de alimentos que presentaron la mayor actividad proteolítica (mayor a 5 mm), las que presentaron igual tamaño de halo a la cepa control (5 mm) y algunas de las que presentaron un halo menor a 5 mm.

<b>TABLA 2. Halo de degradación de algunas cepas de <i>B. cereus</i> en agar caseína.</b>					
<b>Cepa</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>Imagen</b>	<b>Cepa</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>Imagen</b>
NVH 1230	1		ATCC 27348	1	

ATCC 14579	1,5		NVH 1257	5	
154	6,25		372	5,5	
26	5,5		246-15	5,25	
395	5,25		196	5,25	
172	5		299-2	5	
372-2	5		246-18	5	
382-2	3,75		134-2	1	

#### 4. DISCUSIÓN

El género *Bacillus* ha sido reportado como uno de los principales géneros de microorganismos productores de proteasas y lipasas por lo que, enzimas de diversas especies de *Bacillus* han sido utilizadas a nivel industrial gracias a su versatilidad de aplicaciones. La búsqueda de microorganismos nativos que permitan tener mejores productividades es constante y es uno de los factores más importantes a la hora de fabricar nuevos productos para mejorar la calidad de vida y los diferentes procesos industriales [4,9].

En este estudio se evaluó la actividad proteolítica de 207 cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos y se valoró el halo de proteólisis en medio caseína. Para ello, se estandarizó una metodología en medio sólido para valorar la intensidad de enzimas tipo proteasa producida por las diferentes cepas de *Bacillus cereus* previamente aisladas de alimentos, lo anterior porque en la literatura se han reportado diferentes condiciones, en función del volumen de inóculo, tipo de medio y tiempo de incubación para evaluar la producción de enzimas proteolíticas [10].

Específicamente, en cuanto a la producción de enzimas de tipo proteasa, los resultados en diversas investigaciones indican que se ve altamente influenciada por los nutrientes que posee el medio de cultivo ya que la síntesis de enzimas proteasas se favorece con la adición de sustratos proteicos, razón por la cual en el presente estudio se adicionó caseína y leche descremada al medio [10].

Otro factor importante en la producción enzimática por parte de los microorganismos es el tiempo de incubación, en este caso, se seleccionó un tiempo de incubación de 48 h dado que como se observa en la Figura 2, la hidrólisis de la caseína se estabilizó a partir de las 48 h de incubación, siendo innecesario mayores tiempos de incubación. Se conoce que la mayor secreción de enzimas al medio se obtiene al final de la fase exponencial en donde el metabolismo de *Bacillus* se adapta a condiciones como la falta de nutrientes mediante la secreción de enzimas hidrolíticas permitiendo la degradación de sustratos polipeptídicos a moléculas más pequeñas que puedan ser absorbidas por la célula [1].

Posterior a esta fase se da una disminución de la producción enzimática, lo cual puede deberse al cambio de pH que se da por la producción de diferentes metabolitos producto del crecimiento. Como se mencionó anteriormente, el pH

afecta la secreción de enzimas debido a que influye en el crecimiento de los microorganismos y su regulación metabólica pues estos son sensibles a la concentración de iones de hidrógeno presentes en el medio lo cual puede explicar la reducción en el incremento del halo de hidrólisis de la caseína posterior a 48 h de incubación [5,10].

La caseína es un polímero proteico complejo que comprende entre un 76-86% de las proteínas totales de la leche, contiene agregados de micelas ( $\Delta$ -,  $\beta$ - y  $k$ -caseína) y fosfato coloidal cálcico. Estudios previos han reportado que las proteasas producidas por las bacterias del género *Bacillus* degradan en primer lugar la caseína, lo cual puede deberse a que dicha molécula está ubicada en la superficie de la micela, permitiendo una degradación inicial de esta por parte de la proteasa que produce el microorganismo y posterior a esta se degradan las demás proteínas que componen el suero de la leche [11,12].

En este estudio se encontró que todas las cepas tenían actividad proteolítica, pero al clasificarlas de acuerdo con el halo de degradación de la cepa control (halo de degradación de 5 mm), se encontró que 6 cepas presentaban un halo de degradación superior a 5 mm, 4 cepas presentaron halos de degradación iguales a la cepa control (5 mm) y las 197 cepas restantes presentaron halos inferiores a 5 mm (Tabla 1), comprobando así lo reportado en investigaciones previas donde se ha evidenciado que cepas de *B. cereus* aisladas de diferentes matrices han presentado altas actividades proteolíticas [9]. Así mismo, se puede evidenciar que según esta clasificación cualitativa la cepa de *B. cereus* 154 aislada de alimentos presentó la más alta actividad proteolítica (el mayor halo de degradación 6,25 mm), es decir, un halo de degradación de la caseína superior a la cepa control. Por esta razón, se considera que esta cepa tiene gran potencial para su uso biotecnológico, ya que muchas enzimas utilizadas en la industria, derivan de éste tipo de microorganismos, de los cuales se han caracterizado diferentes enzimas y se ha encontrado que son estables frente a diferentes condiciones de pH y temperatura [13]. Se ha demostrado que las proteasas de *Bacillus* tienen una alta actividad enzimática en un rango de pH de 6 a 11 y son estables a temperaturas entre los 30 y 70°C siendo esta estabilidad uno de los factores determinantes para ser seleccionadas como

enzimas de uso industrial [3]. Sin embargo, esta cepa 154 es una cepa candidata muy promisoriosa para producir enzimas de tipo proteasa.

Como se mencionó anteriormente, la caseína es degradada con facilidad por las proteasas de *Bacillus* [11], es por esto, que los investigadores continúan evaluando la actividad enzimática proteolítica de diferentes especies de *Bacillus* en agar caseína, entre estas, *B. cereus*. En Argentina, un estudio publicado en el año 2015 reportó la actividad proteolítica de 5 cepas de *B. cereus* aisladas de repollo fermentado, utilizando un inóculo de 20  $\mu\text{L}$  en un medio basal modificado suplementado con leche descremada a 32°C y 48 h de incubación, se usó como control la enzima proteasa, en este se observaron que los halos de degradación de las 5 cepas de *B. cereus* oscilaban entre 22,3 y 28,3 mm y de la enzima proteasa se obtuvo un halo de degradación de 18,6 mm [14].

En un estudio llevado a cabo en la India en el año 2018 se logró aislar de muestras de suelo un total de 30 cepas de *Bacillus* sp. de las cuáles 8 presentaron el halo de proteólisis de mayor tamaño entre las cepas evaluadas en dicho estudio [15]. En el año 2020 en Perú, de muestras de suelos se logró aislar 35 cepas identificadas como *Bacillus* sp. de las cuales 4 presentaron una alta actividad proteolítica en un medio sólido que contenía leche descremada [6]; en el mismo país, en el año 2018 se reportó el aislamiento de 34 cepas de *Bacillus* spp en las cuales se evaluó la hidrólisis de la caseína, las cepas exhibieron halos de degradación que oscilaban entre 0,9 y 19 mm de diámetro [5].

Estudios realizados en Burkina Faso en el año 2003 se evaluó la actividad proteasa en agar caseína de 8 cepas de *Bacillus subtilis* y 2 cepas de *Bacillus pumilus* aisladas e identificadas a partir de Soumbala, un condimento típico de África occidental. La capacidad de degradar las proteínas en agar caseína fue valorado utilizando una cantidad de inóculo de 100  $\mu\text{L}$ , a una temperatura de 37°C y un periodo de incubación de 48 h, se obtuvo como resultado halos de degradación que oscilaron entre 28 y 32,2 mm de diámetro para las diferentes cepas de *B. subtilis* mientras que para las dos cepas de *B. pumilus* se obtuvieron halos de degradación 24 y 26 mm [16].

Un estudio realizado en la India en el año 2011 evaluó la capacidad de producir proteasas de diferentes aislamientos bacterianos obtenidos de muestras estuarinas. Se inoculó 100 µL de cada aislado en placas de agar caseína y se incubó a 37°C durante 48 horas. La valoración de la actividad proteasa se realizó midiendo la zona clara que se formaba alrededor de la colonia. Dentro de todos los aislamientos evaluados, se seleccionaron 8 aislamientos que presentaban los mayores halos de degradación, el aislamiento identificado como *B. cereus* presentó el halo de degradación más grande (17 mm), mientras que los demás aislamientos presentaron halos de degradación que oscilaban entre 8 y 12 mm [17].

El interés por la producción de enzimas a nivel industrial es cada vez mayor, en Quito-Ecuador en el año 2021, se evaluó la actividad proteolítica de 20 cepas termófilas aisladas de compostaje en donde se inocularon 50 µL de cada cultivo en agar LB suplementado con leche descremada y se incubaron a 37°C y 55°C durante 24 horas. De las 20 cepas analizadas, sólo 3 mostraron actividad proteolítica, la cual se determinó mediante la formación de zonas hidrolizadas en el medio, estas cepas fueron clasificadas como *Bacillus* y exhibieron la más alta actividad proteolítica a 55°C, lo cual nos da un indicio de la importancia y necesidad de valorar la determinación de actividad proteolítica de las cepas bacterianas a diferentes temperaturas, condiciones de pH y otros parámetros que se podrían tener en cuenta en futuras investigaciones [18].

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con investigaciones anteriores sobre el tamaño de halos de degradación, podemos inferir que las cepas de *B. cereus* del presente estudio presentan una buena actividad proteasa con potencial biotecnológico, puesto que en los estudios anteriores usaron cantidades de inóculo entre cuatro y veinte veces mayor que el inóculo del presente estudio, los halos obtenidos en estas investigaciones fueron superiores a los halos obtenidos en el presente estudio. La metodología de determinación cualitativa para evaluar la actividad proteolítica en agar suplementado con caseína es oportuna y ha sido ampliamente utilizada en diferentes investigaciones ya que permite a través de la formación de halos de hidrólisis la fácil observación de la actividad proteolítica, siendo estos resultados un indicio sobre su posible potencial biotecnológico [2]. Además, los resultados obtenidos en esta investigación sobre la actividad

proteolítica de las diferentes cepas nativas de *B. cereus* servirán como base para la continuación del proyecto que busca obtener enzimas de interés industrial.

## 5. CONCLUSIONES

De las 207 cepas de *Bacillus cereus* estudiadas en la presente investigación, seis de ellas presentaron una actividad proteolítica superior a la cepa control, cuatro cepas una actividad proteolítica igual a la cepa control, mientras que el resto de las cepas presentaron halos de degradación inferiores a la cepa control, lo que indica que las cepas aisladas presentan diversos niveles de expresión de proteasas, y que algunas de ellas exhibieron halos de degradación muy grandes por lo que pudieran ser una buena opción para la producción de enzimas microbianas de interés industrial.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Julian P, Jesus A, Carmona Z. Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. [Tesis en internet]. Universidad Autónoma De Nuevo León. 2011. [Consultado el 12 de abril de 2023]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2955/1/1080224404.pdf>.
2. Montes L. Caracterización bioquímica de la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* lb04 [Trabajo de grado en Internet]. Monterrey, N.L: Universidad Autónoma De Nuevo León; 2020 [consultado el 9 de junio de 2022]. 42 p. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/22380/1/1080315389.pdf>
3. Suberu Y, Akande I, Samuel T, Lawal A, Olaniran A. Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019 Jul;20:101264.
4. Ferrero MA. Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. *Fac ciencias exactas y Nat UBA* [Internet]. 1995;41. Available from: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2745\\_Ferrero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2745_Ferrero.pdf)
5. Solorzano L. Producción de amilasas y proteasas por *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú. [Trabajo de grado en Internet]. La Libertad, Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2018 [consultado el 23 de junio de 2022]. 34 p. Disponible en:

<https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10938/Solorzano%20Polo,%20Leticia%20Ivon.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

6. Gamarra M. Determinación de temperatura y pH para la optimización de la actividad proteolítica alcalina de *Bacillus sp.* aislados de tierras de cultivo de *Zea mays* [Trabajo de grado en Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020 [Consultado el 23 de junio de 2022]. 53 p. Disponible en:[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15239/Gamarra\\_cm.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15239/Gamarra_cm.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. Molina Pimentel JF. Importancia de la biotecnología enzimática en la industria de alimentos. Jour. Bol. Cien. [Internet]. 23 de abril de 2021 [citado 4 de diciembre de 2022];17(Especial):105-6. Disponible en: <https://revistas.univalle.edu/index.php/ciencias/article/view/12>
8. Bhatt HB, Singh SP. Cloning, Expression, and Structural Elucidation of a Biotechnologically Potential Alkaline Serine Protease From a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. Front Microbiol. 2020 Jun 3;11:941.
9. Del Moral S, Ramírez-Coutiño LP, De M, García-Gómez J. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. [cited 2022 Dec 3]; Available from: <http://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000102.pdf>
10. Sattar H, Bibi Z, Kamran A, Aman A, Ul Qader SA. Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. Biocatal Agric Biotechnol. 2019 Sep 1;21:101256.
11. Ouertani A, Chaabouni I, Mosbah A, Long J, Barakat M, Mansuelle P, et al. Two new secreted proteases generate a casein-derived antimicrobial peptide in *Bacillus cereus* food born isolate leading to bacterial competition in milk. Front Microbiol. 2018 Jun 4;9(JUN):1148
12. Sattar H, Bibi Z, Kamran A, Aman A, Ul Qader SA. Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. Biocatal Agric Biotechnol. 2019 Sep 1;21:101256.
13. Ahmadreza Ariyaei, Ayoub Farhadi, Fatemeh Moradian, Ghodrat Rahimi Mianji, Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine

protease gene from native *Iranian Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock, *Gene*, Volume 693, 2019, Pages 10-15, ISSN 0378-1119

14. Kotlar C, Ponce A, Roura S. Characterization of a novel protease from *Bacillus cereus* and evaluation of an eco-friendly hydrolysis of a brewery byproduct. *J Inst Brew* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Nov 29];121(4):558–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.257>
15. Asha B, Palaniswamy M. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jan 22];8(02):119–27. Available from: <http://www.japsonline.com>
16. Ouoba LII, Rechinger KB, Barkholt V, Diawara B, Traore AS, Jakobsen M. Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of Soubala. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2022 Nov 29];94(3):396–402. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2003.01845.x>
17. Kanmani, R., S. Dhivya SJ and PV. Studies on detergent additives of protease enzyme from an estuarine bacterium *Bacillus cereus* [Internet]. *International Research Journal of Biotechnology*. 2011 [cited 2023 Jan 22]. p. 157–63. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/266494061\\_Studies\\_on\\_detergent\\_additives\\_of\\_protease\\_enzyme\\_from\\_an\\_estuarine\\_bacterium\\_Bacillus\\_cereus](https://www.researchgate.net/publication/266494061_Studies_on_detergent_additives_of_protease_enzyme_from_an_estuarine_bacterium_Bacillus_cereus)
18. Rivas Párraga RG. Inferencia de secuencias codificantes de enzimas proteolíticas producidas por cepas bacterianas previamente aisladas de composta [Internet]. *Escuela Politécnica Nacional*; 2021. Available from: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/21661/1/CD%2011139.pdf>