

Bioprospección de *Bacillus* spp para la producción de proteasas con potencial aplicación en alimentos

Miranda Isaías, I.¹, Reyes Nava, L.A.¹, Salamanca Elizarrarás, M.E.¹, Pliego Sandoval, J.E.¹, y Iñiguez Muñoz, L.E.¹
¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva No. 883, Colonia Centro, 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Tel: +52 (341) 575 2222. Correo: luis.reyes@cusur.udg.mx

Palabras clave: alimento, enzima, péptido, proteína

Introducción

Los microorganismos en la industria alimentaria son de gran importancia ya que pueden ser utilizados como probióticos adicionados a alimentos o para la preparación de alimentos como yogurt, queso, cerveza, vino, champagne y licores, así como para la obtención de nutrientes específicos. Generalmente, los microorganismos más utilizados son las bacterias acidolácticas (BAL) que incluyen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, entre otros. Muchos de los efectos benéficos que confieren estos microorganismos es debido a la amplia gama de enzimas que producen, las cuales, son capaces de generar diferentes metabolitos de interés que se pueden adicionar a los alimentos, otorgándoles propiedades funcionales y probióticas. Otros microorganismos que poseen una alta capacidad de producir diversas enzimas de interés alimentario son las bacterias del género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus* son bacilos Gram positivos formadores de endosporas. El género *Bacillus* cuenta con aproximadamente 60 especies que se pueden encontrar principalmente en el suelo. Las diferentes especies de *Bacillus* sintetizan un alto nivel de enzimas proteolíticas durante su crecimiento. La especie más estudiada es *B. subtilis* que secreta en su mayoría serinproteasas, pero también se ha comprobado que las especies de *Bacillus pumilus*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus patagoniensis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halodurans*, entre otras especies, son capaces de secretar una amplia gama de proteasas [1].

Las enzimas producidas por microorganismos bacterianos son de gran importancia en los alimentos debido a su alta capacidad hidrolítica. En la actualidad las enzimas son consideradas aditivos alimenticios, ya que modifican distintas características como su apariencia, textura, aromas, sabores, etc. [2]. Las proteasas representan aproximadamente el 60% de ventas totales de enzimas en el mundo. Estas enzimas hidrolíticas rompen los enlaces peptídicos de las proteínas permitiendo la obtención de péptidos bioactivos con diferentes aplicaciones en alimentos y salud. Los péptidos bioactivos cuentan con un alto valor nutricional y son benéficos para la salud humana como antioxidante, antihipertensiva, hipocolesterolémica, antimicrobiana, etcétera. De igual manera, las proteasas pueden ser utilizadas para la producción de hidrolizados de proteínas utilizados en dietas para infantiles o adultos enfermos. Esta dieta logra ser absorbida en el intestino sin una digestión previa en el estómago [3, 4]. Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de enzimas proteasas de *Bacillus* spp provenientes de suelo agrícola para aplicaciones en la industria de los alimentos.

Metodología

Se recolectaron tres muestras de suelo agrícola; la primera obtenida en un suelo con cultivo de frambuesas, con coordenadas geográficas de 19°44'59.5"N y 103°27'15.3"W (La Catarina); la segunda muestra tomada en una tierra preparada para cultivar, con coordenadas geográficas de 19°44'58.9"N y 103°27'13.9"W (La Catarina); y la tercera muestra recolectada de otro suelo agrícola con cultivo de frambuesas (Green Gold), con coordenadas geográficas de 19°44'57.6"N y 103°27'04.4"W. La toma de muestra consistió en recolectar 200g de la parte superficial del suelo agrícola para la preparación de un medio de cultivo. La muestra para el aislamiento de los microorganismos fue de 50 g y se obtuvo a una profundidad de 10 cm y lo más cercana a la raíz del cultivo.

Para el aislamiento a partir de suelo agrícola, se preparó un medio de cultivo sólido de extracto de suelo. El extracto de suelo fue preparado de la siguiente manera: 200 g de suelo se disolvieron en 400 mL de agua destilada y esta solución fue calentada a ebullición por 10 min en placa calefactora con agitación. Posteriormente, esta solución fue filtrada con manta de cielo y se aforó a 500 mL. A este volumen de extracto de suelo se le agregó agar nutritivo de acuerdo a las especificaciones del frasco y se esterilizaron. De cada muestra colectada de suelo (10 cm profundidad) se disolvió 1 g en 10 mL de agua destilada estéril. Después, con la ayuda de un asa punta de anillo se tomó una alícuota y se estirió por agotamiento sobre las placas Petri preparadas con agar extracto de suelo. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 5 días.

A partir de los cultivos obtenidos se seleccionaron colonias separadas de bacterias con características macroscópicas de *Bacillus* spp (color, forma, consistencia). Las colonias seleccionadas de bacterias fueron cultivadas en agar nutritivo asignándoles un código dependiendo de la procedencia de la muestra: Catarina con cultivo (CCC), Catarina sin cultivo (CSC) y Green Gold (GG). A los microorganismos aislados se les realizaron tinciones de Gram y de esporas para determinar características microscópicas. Después de seleccionar a los microorganismos, se propagaron en caldo nutritivo de 1 a 3 días a 30 °C. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 15 min para recuperar el paquete celular bacteriano. El paquete celular de cada bacteria fue resuspendido en 10 mL de caldo nutritivo al 50% de glicerol, se homogenizó y fueron guardados en muestras de 0.5 mL en microtubos Eppendorf a -20 °C.

Para la identificación de los aislados se tomó una muestra de una colonia aislada fresca y se colocó en una placa MALDI de metal. La muestra fue colocada en dos pocillos, en el primer pocillo se agregó ácido fórmico al 70% y en el segundo solo la muestra bacteriana. Sobre las muestras bacterianas se aplicó una solución matriz HCCA (α -ciano-3, 4-hidroxicinámico). Se dejó reposar hasta la cristalización de la solución matriz junto con el microorganismo. Una vez preparada la muestra se colocó en espectrómetro MALDI-TOF y se ajustaron los datos para comenzar con la identificación. Para el procesamiento de datos se usó el software Flex Control 3.1 y la base de datos Byotype 3.1. La interpretación del valor de puntuación obtenido para cada aislamiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del método: los valores entre 3.000-2.300 indican una identificación de especies altamente probable, los valores de 2.299 a 2.000 indican un género seguro e identificación de especies probable, mientras que las puntuaciones más bajas entre 1.999 y 1.700 se consideran como probable identificación de género.

La actividad proteolítica se determinó en medio sólido agar suplementado con caseína 1% (AC). La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en caja Petri, dividiéndola en cuatro campos para la colocación de una microgota de 5 μ L de 1×10^6 UFC/mL de cada bacteria. La incubación se llevó a cabo a 30 °C por 48 h. La presencia de actividad proteasa se determinó por la formación del halo transparente alrededor del microorganismo revelado con una solución de ácido tricloroacético (ATC) al 5%.

Resultados y discusión

A partir del medio agar extracto de suelo se obtuvieron colonias con formas diferentes: rugosas, lisas e irregulares. Las bacterias aisladas mostraron consistencia mucoide y secas. La morfología microscópica mostró bacterias con forma de bacilos y Gram positivas. Algunas de estas mostraron presencia de endosporas. Las colonias bacterianas que presentaron una tonalidad blanco transparente coinciden con lo encontrado por Gómez-marín *et al.*, (2007) [5] quienes demuestran que algunas colonias bacterianas perteneciente al género *Bacillus* presentan ese tipo de color.

Se seleccionaron y aislaron 4 bacterias que presentaron características del género *Bacillus*. La figura 1 muestra un ejemplo de bacterias aislados junto con su tinción de Gram.

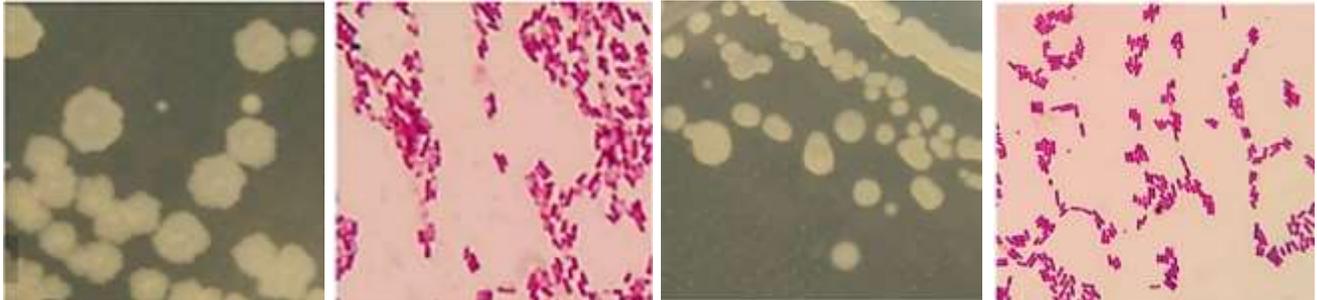


Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas

En la tabla 1 se muestra el registro de bacterias identificadas mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF y en la tabla 2 el nuevo código de aislamiento, asignado según el género y especie identificados. Como se observa se obtuvieron bacterias distintas pertenecientes al género *Bacillus*.

Tabla 1. Identificación de bacterias aisladas de suelo agrícola y *Phyllophaga* spp.

Código asignado	Organismo	Valor de puntuación	Organismo	Valor de puntuación
GG-3	<i>Bacillus subtilis</i>	2.263	<i>Bacillus subtilis</i>	2.191
CCC-2	<i>Bacillus megaterium</i>	2.134	<i>Bacillus megaterium</i>	2.122
CSC-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.055	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp <i>plantarum</i>	2.030
GG-2	<i>Bacillus cereus</i>	2.312	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.029

Tabla 2. Cepas bacterianas identificadas con nuevo código de aislamiento

Aislado	Organismo	Valor de puntuación	Nuevo código para los aislados
GG-3	<i>Bacillus subtilis</i>	2.263	BsGG
CCC-2	<i>Bacillus megaterium</i>	2.134	BmCCC
CSC-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.055	BaCSC
GG-2	<i>Bacillus cereus</i>	2.312	BcGG

La cepa bacteriana con código GG-2 fue identificada como *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*. Sin embargo, la puntuación para *Bacillus thuringiensis* fue de 2.029 mientras que para *Bacillus cereus* fue de 2.312, por lo que, se considera que esta última es la probable identificación de este microorganismo. La similitud de un microorganismo con otro puede causar variaciones al momento de su identificación. Ha *et al.*, (2019) [6] mencionan que *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, al contar con una alta similitud genética y fenotípica, podrían representar la misma especie. Asimismo, estos autores no encontraron diferencias significativas entre una especie y otra al analizar estas cepas por espectrometría MALDI-TOF. Esto significa, que se puede tener certeza del género, pero no de la especie, aunque se podría complementar con la caracterización genética. De igual manera Ulrich *et al.*, (2019) [7] afirman que no es posible una identificación fiable de *B. cereus* mediante la técnica de MALDI-TOF, por lo que es necesario la utilización de más bases de datos moleculares.

Todas las cepas aisladas presentaron halo de hidrólisis sobre caseína (figura 2), esto significa que las 4 cepas aisladas fueron capaces de producir proteasas que permitieron la degradación de la caseína. Como se puede observar, la cepa BsGG (*Bacillus subtilis*) fue la que presentó el tamaño del halo mayor que las demás, seguida de la cepa BaCSC (*Bacillus amyloliquefaciens*) y BcGG (*Bacillus cereus*), mientras que, la cepa BmCSC (*Bacillus megaterium*) fue la que presentó el halo menor de hidrólisis. La presencia de halo se debe a la capacidad de degradar caseína por medio de enzimas hidrolíticas proteasas. Resultados similares son reportados por Guevara *et al.*, (2017) [8] quienes confirman actividad proteolítica de cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp mediante la formación de un halo o cambio de color en el medio con caseína. De la misma forma, solo el crecimiento del microorganismo en este medio sin mostrar el halo demuestra la producción de proteasa, ya que esto indica que la bacteria logro utilizar la caseína como suplemento nutritivo.



Figura 2. Prueba de visualización de actividad proteasa de cepas de *Bacillus* en medio sólido revelado con ATC.

Conclusiones

Se aislaron 4 bacterias del género *Bacillus*, las cuales de acuerdo a la fuente de aislamiento fueron clasificadas como GG-3, CCC-2, CSC-3 y GG-2. Estas bacterias fueron identificadas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*, respectivamente. Todas las cepas presentaron actividad proteasa positiva en caja Petri con agar-caseína. Estos resultados muestran que, las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* obtenidas de suelo agrícola, cuentan con una alta capacidad de producir enzimas de interés con potencial de uso en la industria de los alimentos, ya sea como aditivo de alimentos o en la producción de péptidos bioactivos a través del fraccionamiento de sustratos proteínicos por hidrólisis.

Bibliografía

- 1.-Zaragoza Carmona J. A. J. Tesis de maestría. (2011). *Aislamiento de cepas de Bacillus productores de proteasas con potencial uso industrial*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- 2.-Moral S., Ramírez-coutiño L. P., García-gómez, M. D. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *RelbCi* 2(3): 87–102.

- 3.-Borja-Lozano, J. E. Tesis de licenciatura. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* (" tarwi ") mediante proteasas de *Bacillus* sp. En Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- 4.-Paredes, L. A., Flores Fernández, C. N., Zavaleta, A. I. (2017). Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas* sp. m211 en fermentación sumergida. Rev Soc Quím Perú, 83(4): 449–462.
- 5.-Gómez-marín, A. M., Naranjo-fernández, D., Inés, O., Campuzano, M. (2007). Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp. RCCB, 38(1): 55–61.
- 6.-Ha, M., Jo, H. J., Choi, E. K., Kim, Y., Kim, J., Cho, H. J. (2019). Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. JMB, 29(6): 887–896.
- 7.-Ulrich, S., Gottschalk, C., Dietrich, R., Märtilbauer, E., Gareis, M. (2019). Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. Food Microbiol, 82: 75–81.
- 8.-Guevara Suárez, I. del carmen, Guido Saldaña, N. J. Tesis de licenciatura. (2017). Selección de cepa de *Bacillus* spp probiótica autóctona con mayor actividad enzimática. En Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.