

T  
328

 **ARCHIVO HISTÓRICO**  
**SERVICIOS DE INFORMACIÓN**

83781

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Purificación y Caracterización de una Proteasa de  
*Pseudomonas* sp.

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A :

Maestro en Biotecnología Ernesto Alanís García.

H. Jurado: Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta (Directora, UAM-I).

Dr. Andrés Hernández Arana (Asesor, UAM-I).

Dr. Javier Barrios González (Asesor, UAM-I).

Dra. Carmen Wachter Rodarte (Sinodal externa, UNAM).

Dr. Carlos Regalado González (Sinodal externo, Universidad de Querétaro).

30 de Octubre del 2003.

---

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

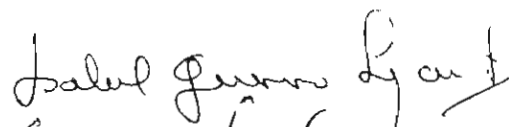


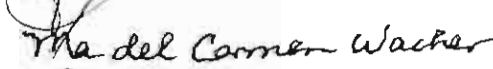

---

El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
De las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M. en B. Ernesto Alanís García

El día 30 de Octubre del año 2003

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta.   
Asesor: Dr. Andrés Hernández Arana.   
Asesor: Dr. Javier Barrios González.   
Sinodal: Dra. Carmen Wachter Rodarte.   
Sinodal: Dr. Carlos Regalado González. 

---

---

## Dedicatorias y Agradecimientos.

Dedico esta tesis a mi esposa Silvia y a mis hijos Ernesto, Lucía y Sebastián. Gracias por formar parte de mi vida y compartir nuevas experiencias.

Agradezco a la Dra. Isabel Guerrero por su tutoría y amistad, así como también al Dr. Andrés Hernández y al Dr. Javier Barrios por sus consejos y asesorías durante la realización de este trabajo. A mis compañeros y amigos del laboratorio de la UAM-Izt y compañeros de trabajo de la UAEH-ICSA por su apoyo y comprensión durante la realización de este trabajo.

A mis padres y hermanos que en todo momento han estado a mi lado compartiendo éxitos y tropiezos. Gracias por su apoyo.

Un agradecimiento especial al Dr. Francisco José Fernández Perrino (UAMI) y al Dr. Martín Collins (Universidad de Queen de Belfast, Irlanda del Norte) por compartir sus conocimientos.

Agradezco a la UAM-Izt y al CONACyT por el apoyo económico y la confianza otorgada durante el tiempo que duró este trabajo de investigación. Así como también a la red ALFA por permitirme realizar una parte de mi trabajo experimental.

*Ernesto.*

---

# Contenido.

	Pág.
Índice de tablas.	iv
Índice de figuras.	vi
Índice de abreviaturas.	x
Resumen.	1
Summary.	5
1. Introducción.	8
2. Revisión Bibliográfica.	10
2.1. Diversidad del género <i>Pseudomonas</i> .	10
2.1.1. Causas de la diversidad.	11
2.2. Aspectos taxonómicos del género <i>Pseudomonas</i> .	13
2.3. Métodos de identificación y clasificación de bacterias.	16
2.3.1. Estudios de similitud de ARN ribosomal (ARNr) en la identificación de <i>Pseudomonas</i> sp.	18
2.4. Enzimas proteolíticas.	20
2.5. Generalidades de proteasas extracelulares de <i>pseudomonas</i> .	26
2.5.1. Producción de proteasas.	29
2.5.2. Factores que intervienen en la producción de enzimas extracelulares.	30
2.6. Regulación de la síntesis de proteasas.	32
2.6.1. Mecanismos de secreción de proteasas.	36
2.7. Purificación y caracterización de proteasas de <i>P. fluorescens</i> .	39
2.8. Plásmidos.	51
2.8.1. Plásmidos en <i>Pseudomonas</i> sp.	52
2.8.2. Técnicas de curado.	56
2.8.3. Extracción y purificación de plásmidos.	57

<b>3. Objetivos.</b>	<b>59</b>
3.1. <i>Objetivos Generales.</i>	59
3.2. <i>Objetivos Particulares.</i>	59
<b>4. Metodología.</b>	<b>61</b>
4.1. <i>Optimización de la producción de proteasas de Pseudomonas sp.</i>	62
4.2. <i>Purificación de proteasas.</i>	66
4.2.1. Cromatografía hidrofóbica.	67
4.2.2. Cromatografía de filtración en gel.	68
4.2.3. Cromatografía de intercambio iónico.	68
4.2.4. Isoelectroenfoque.	69
4.3. <i>Caracterización de proteasas.</i>	71
4.3.1. pH óptimo y estabilidad a pH.	71
4.3.2. Temperatura óptima y termoestabilidad.	72
4.3.3. Efecto de iones e inhibidores.	72
4.3.4. Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).	73
4.4. <i>Eliminación de plásmidos (Curado).</i>	74
4.4.1. Incubación a temperatura alta.	74
4.4.2. Intercalado de colorantes (naranja de acridina).	75
4.4.3. Incubación en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS).	75
4.4.4. Pruebas con antibióticos (antibiograma).	76
4.5. <i>Extracción y purificación de plásmidos.</i>	78
4.5.1. Procedimiento rápido para detección y aislamiento de plásmidos grandes y pequeños.	79
4.6. <i>Identificación de las dos cepas de Pseudomonas por determinación del porcentaje de homología del gen ARNr 16S con cepas tipo.</i>	81
4.6.1. Aislamiento de ADN.	81
4.6.2. Amplificación del gen ADNr 16S.	82
<b>5. Resultados y Discusión.</b>	<b>86</b>
5.1. <i>Optimización de la producción de proteasas de Pseudomonas sp.</i>	86
5.1.1. Efecto de medio base y suplementado sobre el crecimiento.	86
5.1.2. Efecto de medio base y suplementado sobre la actividad proteolítica.	90
5.2. <i>Producción y purificación de proteasas.</i>	95
5.2.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica.	96
5.2.2. Cromatografía de filtración en gel.	98
5.2.3. Isoelectroenfoque.	101
5.2.4. Cromatografía de intercambio iónico.	103

5.3. Caracterización de proteasas.	105
5.3.1. pH óptimo y estabilidad al pH.	105
5.3.2. Temperatura óptima y termoestabilidad.	107
5.3.3. Efecto de iones metálicos e inhibidores.	111
5.3.4. Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).	116
5.4. Tratamientos de curado.	118
5.5. Extracción y purificación de plásmidos.	121
5.6. Determinación del porcentaje de homología del gen <i>alkB</i> 16S de las dos cepas de <i>Pseudomonas</i> con cepas tipo.	125
<b>6. Conclusiones.</b>	<b>131</b>
<b>7. Bibliografía.</b>	<b>133</b>
<b>Anexo I.</b>	<b>155</b>
<b>Anexo II.</b>	<b>158</b>
<b>Anexo III.</b>	<b>164</b>



## Índice de tablas.

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Peso molecular, pH y temperatura óptimos de proteasas de <i>Pseudomonas</i> sp.	28
Tabla 2. Propiedades de algunos plásmidos conjugativos y no conjugativos de organismos Gram-negativos.	52
Tabla 3. Plásmidos-R en <i>Pseudomonas</i> .	53
Tabla 4. Plásmidos codificadores de resistencia a iones metálicos, pesticidas y luz UV.	55
Tabla 5. Plásmidos catabólicos en <i>Pseudomonas</i> .	56
Tabla 6. Lista de antibióticos empleados y sus concentraciones.	77
Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos selectivos para el género <i>Pseudomonas</i> .	82
Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen ADNr 16S.	84
Tabla 9. Purificación de proteasa de <i>Pseudomona</i> sp. C61.	100
Tabla 10. Purificación de proteasa de <i>P. fluorescens</i> B52.	100
Tabla 11. Efecto de iones metálicos sobre la actividad proteolítica.	113
Tabla 12. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.	115
Tabla 13. Resultados de la aplicación de antibióticos.	119
Tabla 14 Relación de volúmenes para cada muestra experimental.	158
Tabla 15. Relación de valores de pH, sustrato y amortiguadores para la determinación de pH máximo de actividad enzimática.	159
Tabla 16. Relación de soluciones amortiguadoras empleadas en la determinación de pH máximo de actividad enzimática.	159
Tabla 17. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de iones e inhibidores.	160
Tabla 18. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de SDS.	160

Tabla 19. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de urea.	161
Tabla 20. Relación de volúmenes para el tratamiento con naranja de acridina.	161
Tabla 21. Reactivos para la etapa de amplificación del gen ADNr 16S.	162
Tabla 22. Condiciones de amplificación con oligonucleótidos Ps-for y Ps-rev.	162
Tabla 23. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para los diferentes tratamientos.	163

## Índice de figuras.

	Pág.
Figura 1. Relación filogenética del grupo protobacteria conteniendo especies que antiguamente o inicialmente fueron asignadas al género de <i>Pseudomonas</i> (negritas) y grupos elegidos.	16
Figura 2. Resolución relativa de técnicas de ADN y huella digital.	17
Figura 3. Subunidad 70S del ribosoma de procariontes.	18
Figura 4. Distribución mundial de ventas de enzimas.	22
Figura 5. Organización de los operones de las secuencias de los genes de producción y secreción de proteasas de (a) <i>E. chrysanthemi</i> , (b) <i>P. aeruginosa</i> y (c) <i>P. fluorescens</i> .	38
Figura 6. Areas de inoculación en placas de los diferentes tratamientos de curado y testigo.	77
Figura 7. Zonas de unión de los oligonucleótidos iniciadores y dirección de amplificación del segmento de ADRr 16S.	85
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> C61, a 19°C, 200 rpm en tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl <sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl <sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl <sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (*); y Leche en polvo 0.4% (O).	88
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> C61, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl <sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl <sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl <sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (*); y Leche en polvo 0.4% (O).	88
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> C61, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl <sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl <sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl <sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (*), y Leche en polvo 0.4% (O).	88

- Figura 11. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 89
- Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 89
- Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 89
- Figura 14. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 92
- Figura 15. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 92
- Figura 16. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 92
- Figura 17. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52 C61, a 19°C, 200 rpm en caldo tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 93
- Figura 18. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 93
- Figura 19. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O). 93
- Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato de extractos enzimáticos de *Pseudomonas* C61 producidos en los diferentes medios: a) medio

BHI; b) medio BHI con $\text{CaCl}_2$ 5 mM; c) medio BHI con leche descremada en polvo 0.4%; d) Marcador de peso molecular; e) Medio TSB; f) Medio TSB con $\text{CaCl}_2$ 3 mM; g) Medio TSB con $\text{CaCl}_2$ 5 mM.	94
Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato de extractos enzimáticos de <i>P. fluorescens</i> B52 producidos en los diferentes medios: a) medio BHI; b) medio BHI con leche descremada en polvo 0.2%; c) Marcador de peso molecular; d) Medio BHI con leche descremada en polvo 0.4%, e) Medio TSB, f) Medio TSB con $\text{CaCl}_2$ 5 mM; g) Medio TSB con leche descremada en polvo 0.4%.	95
Figura 22. Purificación parcial de proteasas de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 en Phenyl-Sepharosa CL-4B. mg Prot/mL ( $\Delta$ ); unidades enzimáticas ( ).	97
Figura 23. Purificación parcial de proteasas de <i>P. fluorescens</i> B52 en Phenyl-Sepharosa CL-4B. mg Prot/mL ( $\Delta$ ); unidades enzimáticas ( ).	97
Figura 24. Purificación parcial de proteasas de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 en Sephacryl S-100-HR. mg Prot/mL ( $\Delta$ ); unidades enzimáticas ( ).	99
Figura 25. Purificación parcial de proteasas de <i>P. fluorescens</i> B52 en Sephacryl S-100-HR. mg Prot/mL ( $\Delta$ ); unidades enzimáticas ( ).	99
Figura 26. Purificación parcial de proteasas de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 en DEAE A. Absorbancia a 280 nm ( ); unidades enzimáticas ( $\Delta$ ); gradiente de NaCl (----).	104
Figura 27. Purificación parcial de proteasas de <i>P. fluorescens</i> B52 en DEAE A. Absorbancia a 280 nm ( ); unidades enzimáticas ( $\Delta$ ); gradiente de NaCl (----).	104
Figura 28. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la proteasa de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 ( ) y <i>P. fluorescens</i> B52 ( $\Delta$ ).	106
Figura 29. Estabilidad de pH de la proteasa de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 ( ) y <i>P. fluorescens</i> B52 ( $\Delta$ ) a diferentes valores.	107
Figura 30. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 ( ) y <i>P. fluorescens</i> B52 ( $\Delta$ ).	108
Figura 31. Estabilidad a diferentes valores de temperatura de la proteasa de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 ( ) y <i>P. fluorescens</i> B52 ( $\Delta$ ).	110

Figura 32. Gráfico de Lineweaver-Burk de la reacción de velocidad contra la concentración de caseína como sustrato de: (a) proteasa de <i>Pseudomonas</i> sp. C61; (b) proteasa de <i>P. fluorescens</i> B52.	117
Figura 33. Crecimiento de cepas curadas y nativas en placas de TSA con diferentes antibióticos y caseína al 2%.	120
Figura 34. Resolución de extracción de plásmidos en gel de agarosa 0.8% a 25 volts constante. (a) $\lambda$ / Hind III; (b) <i>Pseudomonas</i> sp. C61. (c) <i>P. fluorescens</i> B52.	122
Figura 35. Resolución de ADN cromosómico (Cro) y plasmídico (Pla) de <i>Pseudomonas</i> . (a) $\lambda$ / Hind III; (b) <i>Pseudomonas</i> C61-Cro; (c) <i>Pseudomonas</i> C61-Pla; (d) M1 <i>Pseudomonas</i> C61-Cro; (e) M1 <i>Pseudomonas</i> C61-Pla; (f) M2 <i>Pseudomonas</i> C61-Cro; (g) M2 <i>Pseudomonas</i> C61-Pla; (h) $\lambda$ / Xho I; (i) <i>P. fluorescens</i> B52-Cro; (j) <i>P. fluorescens</i> B52-Pla; (k) M1 <i>P. fluorescens</i> B52-Cro; (l) M1 <i>P. fluorescens</i> B52-Pla; (m) M2 <i>P. fluorescens</i> B52-Cro; (n) M2 <i>P. fluorescens</i> B52-Pla.	124
Figura 36. Alineación múltiple de nucleótidos de las secuencias de ARNr 16S de <i>Pseudomonas</i> sp. C61 (C61-Ps), <i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. C (Ps flu bv. C), <i>Pseudomonas gessardii</i> (Ps gess) and <i>Pseudomonas fluorescens</i> B52 (B52-Ps).	126

---

## Índice de abreviaturas.

---

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
BHI	Caldo Infusión Cerebro-Corazón
EDTA	ácido etilendiamintetracético
EE	Extracto Enzimático
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
kDa	kilodaltons
kpb	kilopares de bases
$K_m$	constante de Michaelis-Menten
$\beta$ -MCE	$\beta$ -mercaptoetanol
mM	milimolar
NAc	Naranja de Acridina
CN	Caldo Nutritivo
<i>o</i> -FA	<i>o</i> -fenantrolina
pb	pares de bases
RCP	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SLC	Sobrenadante Libre de Células
TCA	Ácido Tricloroacético
TSB	Caldo Trypticaseína y Soya
TSA	Agar Trypticaseína y Soya

## Resumen.

El objetivo de este trabajo fue la purificación y caracterización de proteasas extracelulares de pseudomonas. así como correlacionar la presencia de plásmidos en las cepas con la síntesis de proteasas y por último la identificación de las cepas, para ubicarlas dentro del género de *Pseudomonas* mediante la determinación del porcentaje de homología de la secuencia del gen ARNr 16S con secuencias patrón. Las cepas empleadas fueron *Pseudomonas* sp. C61 aislada de carne de res y *P. fluorescens* B52 aislada de leche, de esta última se ha reportado la producción de una proteasa, la cual ha sido purificada y caracterizada. La primera etapa consistió en optimización de la producción de proteasas en 3 medios base (TSB, BHI, CN). a los cuales se les adicionó diferentes concentraciones de inductores:  $\text{CaCl}_2$  a 1, 3 y 5 mM y leche descremada en polvo a 0.2 y 0.4 %. Obteniendo la mayor producción de proteasas a las 24 h a  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm en el medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM para ambas cepas de pseudomonas. Este medio fue empleado para producir las proteasas y posterior purificación y caracterización de éstas.

Para la purificación de las proteasas, primero se realizó la producción en medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM por 24 h a  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm, posteriormente la fracción celular fue eliminada por centrifugación quedándose sólo con el sobrenadante. Las proteasas contenidas en el sobrenadante se concentraron por precipitación con sulfato de amonio entre 0 y 65% de



saturación. Para la purificación de las proteasas se emplearon métodos cromatográficos (hidrofóbico, filtración en gel) e intercambio iónico) así como también isoelectroenfoque, obteniendo los mejores resultados de purificación por isoelectroenfoque ya que reduce el tiempo de purificación, se obtiene un mayor rendimiento y debido a esto la proteasa de C61, la cual presentó mayor sensibilidad a la ausencia de calcio en las etapas de purificación, se pudo purificar en una mayor cantidad.

Las proteasas obtenidas fueron caracterizadas basándose en su pH óptimo, estabilidad al pH, temperatura óptima y termoestabilidad, así como también el efecto de iones metálicos e inhibidores utilizando caseína como sustrato. Obteniendo para la proteasa de C61 una actividad máxima a pH 8 y para la proteasa de B52 una actividad máxima en un intervalo de pH entre 7 y 9, ubicándolas como proteasas alcalinas. Las dos proteasas presentaron una alta estabilidad en un amplio intervalo de pH de 3.6 a 10: a valores de pH mayores y menores de este intervalo las proteasas perdieron rápidamente su actividad. La proteasa de C61 presentó una actividad máxima a 40°C mientras que para la proteasa de B52 fue entre 40 y 50°C. Con respecto a la termoestabilidad, las dos proteasas son termoestables, presentaron un comportamiento similar entre 5 y 100°C durante un tiempo de incubación de 30 min, las dos presentaron máxima actividad entre 5 y 40°C, posterior disminución entre 40 y 60°C, seguido de un recuperación de la actividad (pero menor) entre 60 y 100°C, con un máximo en 80°C. Este comportamiento ha sido reportado para otras proteasas termoestables de cepas de pseudomonas.

Para determinar el efecto de iones metálicos e inhibidores sobre la actividad de ambas proteasas, se emplearon diferentes concentraciones de sales, agentes quelantes y agentes desnaturizantes. La proteasa de C61 fue más sensible a la presencia de iones  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , así como por los agentes quelante EDTA y *o*-fenantrolina y los agentes desnaturizantes SDS y urea. En cuanto a la proteasa de B52 fueron  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , *o*-fenantrolina, SDS (0.25%) y urea (3 M). El agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol no tuvo efecto sobre la actividad lo cual indica la ausencia de enlaces disulfuro en la molécula. Las proteasas se clasificaron como metaloproteasas.

Se determinó el  $K_m$  de las dos proteasas utilizando caseína como sustrato, el valor de  $K_m$  de la proteasa de C61 fue de 0.20 mg/mL y de B52 de 0.3509 mg/mL. Las dos proteasas presentaron inhibición por sustrato a concentraciones de caseína por arriba de 0.6 mg/mL.

La eliminación de plásmidos o curado de las dos cepas se llevó a cabo a alta temperatura (42°C). El antibiograma realizado nos indica que las dos cepas son resistentes a cloramfenicol, ampicilina, rifampicina y en menor grado a tetraciclina y kanamicina. No se observó correlación entre la producción de proteasas y la presencia de plásmidos en las dos cepas. Las dos cepas portan plásmidos restringidos de gran tamaño.

Por último la identificación de las dos cepas se llevó a cabo mediante la determinación del porcentaje de homología de la secuencia del gen ARNr 16S con secuencias patrón de *Pseudomonas* del banco de secuencias de la EMBL. Los resultados indican que las dos cepas

pertencen al género de *Pseudomonas*. Tanto *Pseudomonas* sp. C61 y *P. fluorescens* B52 presentaron una gran homología (100 y 92 % respectivamente) con *Pseudomonas fluorescens* bv. C y *Pseudomonas gessardii*.

## Summary.

This thesis studied purification and characterization of extracellular proteases obtained from two pseudomonads strain, and the presence of plasmids in proteases synthesis. The strains were also identified as *Pseudomonas* sp. by 16S rRNA gene sequence homology. The studied strains were: *Pseudomonas* sp. C61 isolated from beef, and *Pseudomonas fluorescens* B52, isolated from milk. *P. fluorescens*, the control, reported as protease-producing strain, was previously purified and characterized. The first part of the thesis was focused on protease production optimization. The strains were grown in three basic media (TSB, BHI, CN), added with inducers: CaCl<sub>2</sub> (1, 3 and 5 mM) and skimmed milk (0.2 and 0.4%). The highest production for both strains was obtained when grown in TSB medium + 5 mM CaCl<sub>2</sub> for 24 h at 19±1°C, 200 rpm continuous agitation. This culture medium was later used to produce, purify and characterize the strains.

Protease purification was carried out growing the strains in TSB medium with 5 mM CaCl<sub>2</sub> for 24 h at 19±1°C, 200 rpm. After centrifugation, the cell pellet was discarded. Proteases in the supernatant were concentrated by precipitation with 0 to 65% saturation ammonium sulfate and purified by different chromatographic methods (hydrophobic, gel filtration, ionic exchange) as well as by isoelectrofocusing. The best purification results were

obtained by isoelectrofocusing giving operation time reduction and yield increase. This method allowed the purification of relatively large amounts of protease produced by C61; this protease had the highest sensitivity during the purification stages in the absence of calcium.

The obtained proteases were characterized on the basis of optimum pH, stability to pH, optimum temperature and heat stability, as well as by their behavior in presence of metallic ions and inhibitors, using casein as substrate. The results showed that protease C61 had a maximum activity at pH 8, for protease B52 the maximum activity was in a pH range between 7 and 9. Therefore both were alkaline proteases. The two proteases were highly heat stable in a wide pH range, from 3.6 to 10; outside this range proteases lost their activity in a short time. Maximum activity for protease C61 was at 40°C whereas for B52 it was between 40 and 50°C. Both proteases were heat stable, they showed similar behavior between 5 and 100°C during 30 min incubation time; their maximum activity was between 5 and 40°C, decreasing from 40 to 60°C and were reactivated to lower levels than the original at 60 to 100°C, the maximum was at 80°C. This behavior has been reported for other heat stable pseudomonads.

Several salts, chelants and denaturing agents were tested to study their effect on protease activity. Protease C61 was sensitive to  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  as well as to EDTA and *o*-fenantroline, SDS and urea. Protease B52 was sensitive to  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ , and to *o*-fenantroline, SDS (0.25%) and urea (3M).  $\beta$ -mercaptoethanol, a reducing agent, had no effect on protease activity, indicating the absence of disulphide bonds. The proteases were therefore classified as metal proteases.

$K_m$  was calculated for both proteases using casein substrate: for C61  $K_m = 0.197$  mg/mL, for B52  $K_m = 0.265$  mg/mL. Both proteases showed inhibition by substrate when casein was present at more than 0.6 mg/mL.

Plasmid elimination, or curing, in both strains was carried out at 42°C. Antibiograms showed that the two strains were resistant to chloramphenicol, ampicillin, rifampin and, in a lesser extent, to tetracycline and kanamycin. There was no correlation between protease production and presence of plasmids in both strains; both have large restricted plasmids.

Finally, the two strains were identified by homology percentage of their 16S rRNA gene sequence with a pseudomonads sequence pattern, taken from an EMBL database. The results showed that both strains were of genus *Pseudomonas*. *Pseudomonads* sp. C61 had 100% homology and *P. fluorescens* B52 was 92% with respect to *Pseudomonas fluorescens* bv. C and *Pseudomonas gessardii*.

# 1. Introducción.

---

En los ecosistemas fríos, los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos juegan un papel importante en la biodegradación de materia orgánica. Los psicrótrofos son capaces de dividirse a 0°C y crecer óptimamente a temperaturas alrededor de 20-25°C, mientras que los psicrófilos tienen temperaturas de crecimiento óptimas por debajo de 16°C y una temperatura límite de 20°C (Margesin y Schinner, 1993). Numerosos microorganismos psicrófilos y psicrótrofos provenientes de ambientes fríos tanto terrestres como marinas, se sabe que producen proteasas extracelulares. La producción de proteasas extracelulares ha sido estudiada en una gran variedad de microorganismos incluyendo *Bacillus*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Achromobacter* y *Pseudomonas* (McKellar, 1982).

El género de *Pseudomonas* que agrupa a bacterias Gram-negativas bacilares, aerobias, quimiorganótrofas (o quimiolitótrofas facultativas), oxidasa positivas, con metabolismo respiratorio y, generalmente, dotadas de movilidad mediada por uno o varios flagelos polares. Este género incluye una gran diversidad de especies saprófitas, que habitan en el suelo o en hábitats acuáticos, así como otras muchas que parasitan y causan enfermedades en plantas, animales y en el ser humano. La enorme versatilidad metabólica de las especies de *Pseudomonas* las ha convertido en los organismos de elección, en procesos industriales de biodeterioro o biorremediación.

En los últimos años el interés sobre el estudio de enzimas microbianas ha aumentado, debido a su gran diversidad, alto rendimiento, así como bajo costo de producción a gran escala y su susceptibilidad a manipulación genética en comparación con las enzimas de origen animal y vegetal. El estudio de las enzimas, las cuales son definidas como catalizadores biológicos, es de suma importancia, ya que el conocimiento generado acerca de su producción, aislamiento, purificación y caracterización, permiten establecer estrategias de manipulación *in vivo*. Por otro lado, la poca diversidad de aplicaciones biotecnológicas de proteasas de origen microbiano, así como también su poca disponibilidad comercial. En el caso particular de proteasas del género de *Pseudomonas*, han recibido poca atención las posibles aplicaciones biotecnológicas a escala industrial, y los estudios realizados se han enfocado más al aspecto perjudicial tanto clínico como de alteración de alimentos frescos, mermando su aceptación. Por tal razón el estudio sobre los mecanismos de producción y acción de estas proteasas de *pseudomonas* permitirán comprenderlas mejor y proponer posibles aplicaciones biotecnológicas y ampliar la diversidad de usos biotecnológicos.



## 2. Revisión Bibliográfica.

---

### 2.1. Diversidad del género *Pseudomonas*.

El género de *Pseudomonas* abarca al grupo más diverso y ecológicamente significativo de bacterias sobre el planeta. Los miembros de este género se han encontrado en gran número en la mayoría de los ambientes (terrestres, aguas dulces y marinos) y también formando asociaciones íntimas con plantas y animales. Esta distribución universal sugiere un grado importante de adaptabilidad fisiológica y genética (Spiers y col., 2000).

El género de *Pseudomonas* incluye especies con funciones de importancia ecológica y económica relacionadas con la salud. Algunas especies son patógenas de plantas (De Vos y col., 1985; Stead, 1992), mientras otras son patógenas oportunistas de animales o humanos (Gilligan, 1991; Palleroni, 1992; Tyler y col., 1995). Algunas especies actúan como promotoras de crecimiento y supresión de patógenos en plantas por lo cual han sido usados en el control biológico (Keel y col., 1996; O'Sullivan y O'Gara, 1992). Una propiedad importante de algunas especies o cepas es su versatilidad metabólica, haciéndolas un elemento importante para el uso en biorremediación (Palleroni, 1993; Sayler y col., 1990).

Las evidencias de la diversidad fisiológica se conocieron desde los estudios bioquímicos realizados por Stanier, Palieroni y Doudoroff (1966) en el campus de Berkeley de la Universidad de California. Estos científicos estudiaron la capacidad de cepas de *Pseudomonas* para degradar una gran variedad de sustancias incluyendo compuestos aromáticos (tolueno, *m*- o *p*-xileno, bifenilo), derivados halogenados y residuos recalcitrantes orgánicos (tetra- y diclorobenceno).

La diversidad dentro del género no está limitada a una característica fisiológica, también está reflejada al nivel genético, evidenciando que la diversidad en la arquitectura del genoma, tanto elementos cromosómicos como extracromosomales, es fundamental. Los estudios de huella digital (“fingerprinting”) llevados a cabo por varios investigadores (Grothues y col., 1988; Rainey y col., 1994; Girard y col., 1997) han revelado un alto grado de polimorfismo de fragmentos de restricción tanto entre cepas de una especie como entre cepas estrechamente relacionadas fenotípicamente (Spiers y col., 2000).

### **2.1.1. Causas de la diversidad.**

Muchos reportes documentan la diversidad a nivel del organismo entero (Spiers y col., 2000): otros estudios documentan la diversidad en términos de la secuencia de ADN o de la variación en proteínas específicas u otras macromoléculas, tales como lipopolisacáridos. Raramente son considerados las causas y significados ecológicos de esta diversidad, aunque

las causas evolutivas de la diversidad biológica y su significado son dos de los temas fundamentales y urgentes de investigación en biología.

La diversidad surge y es mantenida a través de la interacción entre factores ecológicos y genéticos (Spiers y col., 2000). La mutación es la última causa, pero la variación generada por mutación y recombinación es ordenada y adaptada por selección, sujeta a las leyes de la genética (Spiers y col., 2000).

Spiers y col. (2000) reportan que con excepción de la extensa colección de genes reguladores, los cuales parecen no ser características particularmente notables de *Pseudomonas*, que hagan del género más evolucionados que otras bacterias. Sin embargo favorecen la explicación de que la diversidad se debe al hecho nada menos que a una historia evolutiva larga y exposición continua a una gama amplia de ambientes espaciales y temporalmente complejos. Una evidencia de que esto puede en verdad ser suficiente es revelada un experimento simple de selección, en el cual genotipos individuales de *Pseudomonas* son propagados en un ambiente espacialmente heterogéneo (un caldo de cultivo estático). En el espacio de una semana esas poblaciones rápidamente diversifican, produciendo un rango de nichos genotípicamente especializados (Rainey y Travisano, 1998). Sin embargo, trabajos sobre una población de *P. fluorescens* mostró que la diversificación es causada, en parte, por simples mutaciones en rutas regulatorias que afectan la expresión espacial y temporal de un polímero surfactante (Spiers y col., 2000). Si la diversificación a esta escala puede suceder en una semana, entonces la diversidad de *Pseudomonas* llega a ser un poco

sorprendente dada la ancestral historia evolutiva del género y la vasta complejidad de ambientes naturales.

## 2.2. Aspectos taxonómicos del género *Pseudomonas*.

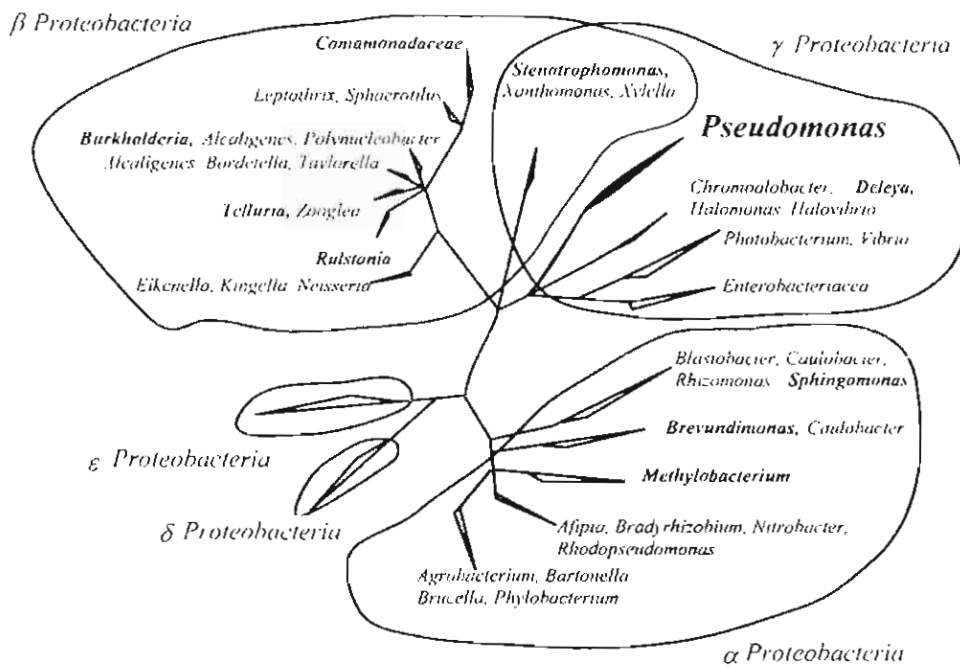
El punto crucial del desarrollo de un sistema taxonómico para *Pseudomonas* fue la introducción de una propuesta que evaluó la relación entre los organismos más distantes, definida por experimentos de hibridación de ADN-ADN, los cuales se han realizado para evaluar la relación entre las especies asignadas a varios grupos fenotípicos.

Al género *Pseudomonas* pertenecen los psicrótrofos más comunes aislados de leche. El tipo no psicrótrofo más importante es *P. aeruginosa*, la cual puede ser fácilmente separada de otras pseudomonas por su crecimiento a 41°C y por su habilidad a producir piocianina (Suhren, 1989). Entre las pseudomonas psicrótrofas de origen lácteo se han descrito: *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* y *P. putrefaciens*. *P. fluorescens* a la vez está dividida en 5 biovariedades y *P. putida* en 2 biovariedades. Las pseudomonas fluorescentes de suelo y agua fueron descritas por primera vez en 1886 por Forster (Suhren, 1989). Se reconocieron dos biotipos, diferenciados por su capacidad de licuar gelatina, lo cual mantuvo los nombres de *P. fluorescens* (licuante) y *P. putida* (no licuante) (Suhren, 1989; Palleroni, 1984; Thomas y Druce, 1971).

Han sido publicados en los últimos 40 años numerosos artículos sobre los aspectos taxonómicos de pseudomonas. Stanier y col. (1966), definieron la diferenciación de *Pseudomonas* sp. por su habilidad de utilizar diferentes compuestos como fuente de carbono. Sin embargo, para llevar a cabo esta clasificación, necesitó de muchas pruebas lo cual es un inconveniente para estudios de naturaleza estrictamente taxonómicas. En microbiología de alimentos el sistema reportado por Shewan y col. (1960), es ampliamente usado; está basado en la habilidad de producir pigmentos fluorescentes y de reaccionar al medio de Hugh y Leifson (1953).

Los estudios taxonómicos han mostrado que algunas cepas pueden ser claramente identificadas a pesar de ligeras variaciones del fenotipo ideal, mientras que otros fenotipos son intermediarios entre *P. fluorescens* y *P. putida* o *P. fluorescens* y *P. fragi* (Samagh y Cunningham, 1972; Juffs, 1973; Richard, 1981; Shaw y Latty, 1982). La distinción entre los intermediarios, sin embargo, no ha sido confirmada con estudios de homología de ADN (O'Connor y col., 1986). Kwan y Skura (1985) no observaron similitud entre el grupo fluorescente y *P. fragi* de leche bronca. La cepa de *P. fragi* aislada no produjo pigmentos fluorescentes o fosfolipasa y no licuó la gelatina. Los aislados del grupo fluorescente – *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* – fueron diferenciados de los aislados de cepas no fluorescentes por sus pigmentos fluorescentes, aunque algunos de los grupos formados no sintetizan pioverdina (*P. fluorescens* biovariedad II y biovariedad V) (Palleroni, 1984).

El género de *Pseudomonas sensu stricto* pertenece a la subclase  $\gamma$  de las protobacterias e incluye tanto a *Pseudomonas* sp. fluorescentes como a algunas especies no fluorescentes (Kerstens y col., 1996) (Figura 1). Este género está formado por: (i) *Pseudomonas* fluorescentes fitopatogénicas citocromo c oxidasa positivo tales como *P. cichorii*, *P. marginalis* y *P. tolaasii*, así como cepas no fitopatogénicas y no necrogénicas tales como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* y las especies de *P. aeruginosa*; (ii) *Pseudomonas* sp. fluorescentes fitopatogénicas necrogénicas sin citocromo c oxidasa: *P. syringae*, *P. virideflava*; (iii) *Pseudomonas* sp. no fluorescentes: *P. fragi*, *P. stutzeri*, *P. mendocrina*, *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes* (Kerstens y col., 1996; Bossis y col., 2000).



Fuente: Bossis y col., 2000.

Figura 1. Relación filogenética del grupo protobacteria conteniendo especies que antiguamente o inicialmente fueron asignadas al género de *Pseudomonas* (negritas) y grupos elegidos.

### 2.3. Métodos de identificación y clasificación de bacterias.

La identificación y clasificación de bacterias son de importancia crucial en la microbiología ambiental, industrial, médica y agrícola, así como en ecología microbiana. Un número de diferentes métodos fenotípicos y genotípicos son empleados para la identificación y clasificación microbiana (Figura 2) (Louws y col., 1996; Rademaker y col., 1997). Cada uno de estos métodos permitió un nivel de clasificación, desde género, especie, subespecie, biovariedad de la cepa. Sin embargo, cada método tiene sus ventajas y desventajas con

respecto a su facilidad de aplicación, reproducibilidad, requerimiento de equipo y nivel de resolución (Akkermans y col., 1995).

Familia	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciación de ADN				
Secuenciación de ADNr 16S				
ARDRA				
Hibridación ADN-ADN				
ARNr-RCP				
ITS-RCP				
RFLP LFRFA PFGE				
Multilocus Isozyme				
Perfil de proteínas de células enteras				
AFLP				
RAPD's APPCR				
rep-PCR				

*Abreviaturas:* ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis; ITS-PCR, Internal transcribed spacers PCR; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphisms; LFRFA, Low frequency restriction fragment analysis; PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis; AFLP, Amplified fragment length polymorphism; RAPD, Random amplified polymorphic DNA; rep-PCR, repetitive extragenic palindromic PCR

Figura 2. Resolución relativa de técnicas de ADN y huella digital.

Para la identificación y clasificación de microorganismos los métodos basados en ADN han emergido como los más confiables, simples y baratos. De hecho, la asignación de género y especie se ha basado tradicionalmente en métodos de hibridación de ADN-ADN (Wayne y col., 1987) y la filogenia moderna se ha basado en el análisis de la secuencia del segmento 16S del ARN ribosomal (Woese, 1987; Stackebrandt y Gocbel, 1994).



### 2.3.1. Estudios de similitud de ARN ribosomal (ARNr) en la identificación de *Pseudomonas sp.*

La información taxonómica puede ser obtenida del ARN ribosomal por la generación de catálogos de nucleótidos y la determinación de las similitudes de secuencias de ARN ribosomal (Jay, 2000). El ribosoma de procariontes es una unidad denominada 70S, la cual está compuesta de dos subunidades funcionales separadas: 50S y 30S. La subunidad 50S está compuesta de ARNr 23S y 5S y un conjunto de cerca de 34 proteínas, mientras la subunidad 30S esta compuesta de ARNr 16S más cerca de 21 proteínas (Figura 3) (Jay, 2000).

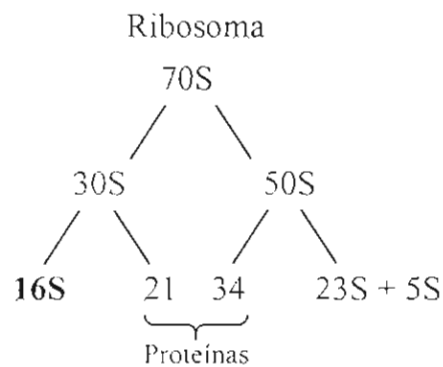


Figura 3. Subunidad 70S del ribosoma de procariontes

La subunidad 16S es altamente conservadora, es decir, de baja tasa evolutiva (1-2% de variaciones en la secuencia cada 50 millones de años) y es considerado un excelente cronómetro molecular de bacterias debido a que es posible determinar el tiempo transcurrido desde la divergencia evolutiva entre organismos lejanamente relacionados así como especies estrechamente relacionadas que comparten la misma molécula. El fragmento ARNr 16S puede

ser secuenciado mediante el uso de transcriptasa reversa. la cual produce un fragmento largo acotado (cerca del 95% de la secuencia total) lo cual permite la determinación precisa de la relación filogenética (Jay, 2000).

Un protocolo específico de detección, independiente del crecimiento, para *Pseudomonas* podría representar una herramienta valiosa en estudios ecológicos y de diagnóstico de este género (Widmer y col., 1998). El último, y quizás la etapa más significativa en el proceso de desarrollo de un sistema taxonómico de especies de *Pseudomonas*. fue la aplicación de estudios de similitud de ARN ribosomal (ARNr) en un esfuerzo para entender la naturaleza peculiar del grupo de las *Pseudomonas*. ya que éste comparte diferentes niveles de similitud de secuencias genómicas en muchas especies (Paileroni, 1993). Los avances recientes en técnicas moleculares, ecológicas y taxonómicas abren una ruta para el diseño de protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) altamente específicos, especialmente en la detección del gen ARNr 16S (Amann y col., 1995; Moyer y col., 1995; Weidner y col., 1996). El diseño de oligonucleótidos iniciadores específicos o cebadores (“Primers”) para amplificar el gen ARNr 16S de un género mediante RCP depende tanto de una taxonomía molecular bien definida como de una serie representativa de secuencias patrón (Boye y col., 1995; Widmer y col., 1998).

Las secuencias nucleotídicas analizadas por los distintos laboratorios son recopiladas regularmente en los bancos de datos informáticos, siendo el GenBank (contratado por el U.S. National Institute of Health), el Ribosomal Database Project (RDP) y el European Molecular

Biology Laboratory (EMBL) los más conocidos e importantes. Todas estas secuencias están disponibles para que los investigadores puedan realizar estudios de sistemática.

Aunque algunos investigadores han intentado usar las diferencias en la secuencia del fragmento ARNr 16S para diferenciar bacterias a niveles de género y especie (O'Callaghan y col., 1994), se ha encontrado que la secuencia ARNr 16S es totalmente invariable cuando se comparan organismos estrechamente relacionados. Sin embargo, éstos no son considerados como patrones óptimos para el desarrollo de pruebas de diferenciación de especie específicas (Tyler y col., 1995).

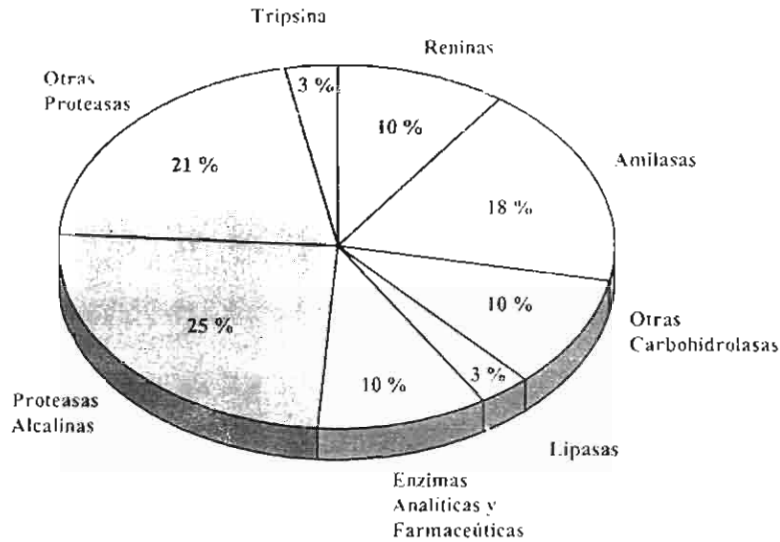
#### **2.4. Enzimas proteolíticas.**

Las proteasas son la única clase de enzimas que ocupan una posición fundamental con respecto a sus aplicaciones tanto fisiológicas como comerciales (Margesin y Schinner, 1993; Roa y col., 1998). Las proteasas son enzimas que catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos. Estas están presentes en todos los organismos vivos, en los cuales desempeñan variadas funciones fisiológicas. Las proteasas pueden ser tanto exopeptidasas, cuando la acción es dirigida sobre el grupo amino o carboxilo terminal de la proteína, o endopeptidasas, la cual rompe enlaces peptídicos internos. Las endopeptidasas, llamadas también proteasas, están divididas en cuatro clases (esta clasificación esta basada en el mecanismo catalítico del centro activo o al efecto del pH): proteasas serínicas (ec 3.4.21) que tienen una histidina en su centro activo y una serina involucrada en el proceso catalítico, proteasas cisteínicas (rc 3.4.22)

las cuales tienen una cisteína en el centro activo, proteasas aspárticas (EC 3.4.23) tiene un pH óptimo por debajo de 5 debido a que está involucrado un residuo ácido en el proceso catalítico. y metaloproteasas (EC 3.4.24) que usan un ion metálico en el mecanismo catalítico (Wandersman, 1989; Margesin y Schinner, 1993).

Los avances en técnicas analíticas han demostrado que las proteasas llevan a cabo modificaciones altamente específicas y selectivas de proteínas tal como activación de formas zimógenas de enzimas por proteólisis limitada, coagulación de sangre y lisis de coágulos de fibrina, procesos y transporte de secreción de proteínas a través de las membranas. En 1996 se reportó un valor estimado de \$1 billón de dólares en ventas de la industria de enzimas a nivel mundial (Godfrey y West, 1996). De la industria de enzimas, el 75% son hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de esta industria y da razón del 60% del total de ventas mundiales (Figura 4) (Roa y col., 1998). Las proteasas ejecutan una gran variedad de funciones, desde nivel celular de órgano y organismo. hasta para producir sistemas en cascada tal como homeostasis e inflamación. Son responsables de procesos complejos involucrados en la fisiología normal de la célula tal como condiciones anormales patofisiológicas. Están involucradas en el ciclo de vida de organismos causantes de enfermedades llegando a tener un objetivo potencial en el desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades fatales tales como cáncer y SIDA. Las proteasas tienen un gran historial de aplicaciones en la industria de alimentos y detergentes. Su aplicación en la industria de la piel o cuero, en etapas de eliminación de pelo y lavado de pieles, sustituye el uso común de

químicos tóxicos (sulfuro de sodio) siendo una alternativa relativamente nueva lo cual da una importancia biotecnológica adicional (Roa y col., 1998).



Fuente. Roa y col., 1998.

Figura 4. Distribución mundial de ventas de enzimas.

Hoy en día, las proteasas de origen animal y vegetal no han podido satisfacer la demanda mundial debido a su baja diversidad, bajo rendimiento y altos costos de producción, por lo cual se ha incrementado el interés en proteasas microbianas. Los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas con una amplia diversidad bioquímica y susceptibilidad de manipulación genética. Las proteasas microbianas cubren aproximadamente el 40% de las ventas totales de enzimas (Godfrey y West, 1996) y son preferidas debido a que

poseen casi todas las características deseadas para sus aplicaciones biotecnológicas (Roa y col., 1998).

A pesar del hecho de que proteasas (ec 3.4.-.-) de varias fuentes (por ejemplo, subtilisina, quimotripsina y papaina) son eficientes y frecuentemente usadas como catalizadores para la formación de ésteres y reacciones de hidrólisis, las proteasas de pseudomonas no han recibido mucha atención, situación anómala si se considera la poca disponibilidad comercial de proteasas de pseudomonas (Wubbolts y Witholt, 1998).

En el caso particular de proteasas del género de *Pseudomonas*, los estudios realizados se han enfocado al aspecto perjudicial tanto clínico (Bodey y col., 1983; Guiot y col., 1981; Schimpff, 1980; Zhou y col., 1997) como de descomposición de alimentos frescos almacenados a temperaturas de refrigeración (Kirsch y col., 1952; Brown y Weidemann, 1958; Ayres, 1960; Jay, 1966; Cousin y Marth, 1977; Law y col., 1977; Stepaniak y col., 1982; Venugopal, 1990; Hernández, M., 1991; Hamilton y Ahmad, 1994) y recientemente en menor medida a aplicaciones industriales (Bustos y Michael, 1994; Wang y Chio, 1998; Oh y col., 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* es el mayor causante de enfermedades nosocomiales, es un patógeno oportunista y puede causar infecciones fatales en huéspedes inmunodeprimidos, en pacientes con leucemia o fibrosis quística (Bodey y col., 1983; Guiot y col., 1981; Schimpff, 1980; Zhou y col., 1997). Esta virulencia está relacionada con la secreción de varias proteínas

extracelulares (Liu, 1974). La *P. aeruginosa* secreta dos proteasas, una alcalina y una elastasa, las cuales son responsables del daño de tejido por degradación de elastina, colágeno y proteoglicano, también son responsables de la degradación de proteínas cuya función es de defensa en el huésped in vivo (Sakata y col., 1993; Vermelho y col., 1996).

Los microorganismos que crecen en carne fresca a temperaturas bajas han sido descritos por varios investigadores (Kirsch y col., 1952; Brown y Weidemann, 1958; Ayres, 1960; Jay, 1966; Venugopal, 1990; Hamilton y Ahmad, 1994). Aquellos que predominan y determinan los cambios a bajas temperaturas en carnes descompuestas son bacterias Gram-negativas de los géneros de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Aeromonas* (Jay, 2000). Los cinco géneros de bacterias Gram-negativas son aerobias, su crecimiento se favorece en condiciones de baja temperatura y alta humedad relativa. La alta solubilidad superficial de gases, en particular O<sub>2</sub>, también favorece su rápido crecimiento. La preferencia de estos microorganismos por sustratos simples sobre los complejos en músculo fue propuesta inicialmente por Beatty y Collins (1939). Estos investigadores especularon que la deterioración del músculo de pescado era caracterizada por dos fases distintas. La primera involucra la oxidación de ácido láctico, nucleótidos, azúcares y otros carbohidratos, mientras que la segunda fase es un ataque sobre aminoácidos y proteínas. El inicio de la descomposición aeróbica está en función del metabolismo de las pseudomonas. Inicialmente estas bacterias crecen a expensas de la glucosa, sin generar subproductos de mal olor. Cuando la densidad celular excede de 10<sup>8</sup>/g de carne, la concentración de glucosa en la carne llega a ser insuficiente para la demanda bacteriana y los microorganismos empiezan a secretar

proteasas, por lo que en esta etapa es esencial el catabolismo de aminoácidos y proteínas para su sobrevivencia (Venugopal, 1990). Las *Pseudomonas* sp. constituyen el único grupo de bacterias predominantes que descomponen a la carne fresca en refrigeración. Este género es dominante en alimentos frescos por virtud de su habilidad para iniciar rápidamente su crecimiento a bajas temperaturas, a su alta tasa de crecimiento y a su competición exitosa con otros psicrótrofos (Gill y Newton, 1977; Gill, 1983; Greer, 1989). Además, su crecimiento no es restringido por el pH dentro de un intervalo de 5.5 a 7.0. Metabólicamente, estas pseudomonas de descomposición tienen una alta capacidad oxidativa, y pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados solubles de bajo peso molecular como fuente de energía (Greer, 1989).

Las *Pseudomonas* llegan a ser la flora dominante, en leche fresca almacenada en refrigeración durante periodos largos, sin embargo son eliminadas junto con el resto de la microflora durante la pasteurización (72°C por 15 seg); secretan proteasas y lipasas termorresistente que causan la descomposición de muchos productos lácteos, especialmente productos esterilizados a temperaturas de ultra pasteurización "UHT" (138°C por 2 seg ó 142°C por 2 seg) (Law y col., 1977; Stepaniak y col., 1982; Hernández, 1991). La aparición de sabores amargos en leche, el espesamiento o la gelificación son las principales alteraciones debidas a la acción de proteasas extracelulares por bacterias psicrótrofas. La mayoría de las proteasas actúan sobre la  $\kappa$ -caseína produciendo la desestabilización de las micelas y la coagulación de la leche de forma análoga a la acción de la quimosina, seguido de una hidrólisis rápida de  $\beta$ -caseína, produciendo péptidos amargos. En cuanto a  $\alpha_s$ -caseína, ésta es



hidrolizada más lentamente que las anteriores, mientras que las proteínas del suero son menos sensibles a la acción de las proteasas (Law y col., 1977; Cousin y Marth, 1977).

Una de las aplicaciones industriales prometedoras de proteasas de este género es en la desproteínización de desperdicios de crustáceos. Oh y col. (2000) caracterizaron una proteasa de *P. aeruginosa* K-187 útil para la desproteínización de desperdicios de caparazón de camarón y cangrejo, reportaron una remoción de proteína del 67% con la proteasa inmovilizada y del 72% cuando se empleó la enzima libre. La eficiencia de desproteínización de esta cepa es mayor que la reportada para *P. maltophilia*, una bacteria proteolítica muy eficiente en la desproteínización de desperdicio de caparazón de camarón (Bustos y Michael, 1994; Wang y Chio, 1998).

## 2.5. Generalidades de proteasas extracelulares de pseudomonas.

Estas enzimas tienen características bioquímicas e inmunológicas muy diversas. Los pesos moleculares de las distintas proteasas de *Pseudomonas* sp. varían de 20 a 50 kDa (Gebre-Egziabher y col., 1980). Existen exclusivamente como monómeros, y pueden generar varias formas activas a partir de un precursor común (Noreau y Drapeau, 1979).

Las proteasas extracelulares de *Pseudomonas* están caracterizadas como metaloproteasas (Mitchell y col., 1986). Sus apoenzimas son activadas por  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ,

aunque las concentraciones elevadas de estos elementos pueden inhibirlas (Azcona y col., 1988).

El pH óptimo de actividad de las proteasas extracelulares está próximo a la neutralidad o es alcalino, variando en un intervalo de 6.5 a 8.3. Sin embargo, el intervalo de pH en el cual estas enzimas son activas es muy amplio conservando al pH normal de la leche una actividad considerable (Hernández, 1991). La temperatura óptima de actividad de estas enzimas se encuentra entre 30-45°C (Tabla 1). no obstante puede mantener una actividad considerable a temperatura de refrigeración (1 a 8°C) (Alford y Elliot, 1960), repercutiendo este hecho directamente en la calidad tanto de carne como de leche y de los productos lácteos conservados a bajas temperaturas.

*P. fluorescens* son los psicrótrofos más estudiados, sus proteasas altamente termoestables han sido aisladas y caracterizadas (Richardson, 1981; Stepaniak y col., 1982; Patel y col., 1983b; Mitchell y Marshall, 1989; Kohlmann y col., 1991; Schokker y van Boekel, 1998; Fernández y col., 1999), así como también se ha determinado su composición de aminoácidos (Patel y Bartlett, 1988).

Tabla 1. Peso molecular, pH y temperatura óptimos de proteasas de *Pseudomonas* sp.

	PM (kDa) <sup>a</sup>	pH	T (°C)	Referencia
<i>P. fluorescens</i>				
AR-11	38.4 g	6.5	35	Alichanidis y Andrews, 1977.
B52	46.9 g	6.0-10.5	45-50	Richardson, 1981
AFT 36	46.2 g	6.5	45	Stepaniak y col., 1982
T16	38 s	7.4	40-45	Patel y col., 1983b
NCCO 2585	40 g	8.3	39	Fairbairn y Law, 1986b
OM2	41 g, 47 s	8.3	45	Mitchell y col., 1986.
OM41	39 g, 48 s	7.8	44	Mitchell y col., 1986
OM82	42 g, 49s	8.2	45	Mitchell y col., 1986
OM86	41 g, 49s	8.8	40	Mitchell y col., 1986
OM227	40 g, 49 s	8.5	39	Mitchell y col., 1986.
OM228	44 g, 49s	8.7	37	Mitchell y col., 1986
PI	48 s	6-8.5	45	Stepaniak y col., 1987
AN70	-	7.4	35-40	Azeona y col., 1988.
M 3/6	45	6.0-8.5	23-45	Kohlmann y col., 1991
164/03	51	7.4-7.5	40	Margesin y Schinner, 1992
165/14	48.6	7.8	40-45	Margesin y Schinner, 1992
177/30	49	7.7-7.8	45	Margesin y Schinner, 1992
No. 33	48	8.0-9.8	30-35	Kumura y col., 1993
114	47	6.5-10	35	Hanamoto y col., 1994
INJA 745 I	48.64	7.0	45	Fernández y col., 1999
II	54.88	7.0	45	Fernández y col., 1999
III	56.32	8.0	45	Fernández y col., 1999
<i>P. fragi</i> ATCC 4973				
Mutante	40 g, 50 s	6.5-8.0	40	Porzio y Pearson, 1975.
Mutante	52 s	8.0	-	Noreau y Drapeau, 1979
Mutante	52 s	7-8.5	-	Haghtani y col., 1995
<i>P. maltophilia</i>				
CS20-1A	35 g	10	37	Boettling, 1975
	19 s, 27 s, 46 g	10.5	55	Kobayashi y col., 1985
<i>P. aeruginosa</i>				
CRC 15541	-	7.0	60	Lu y Chang., 1996.
K 187	58.8	8	50	Oh, y col., 2000
<i>P. putrefaciens</i>				
		7-8	37	Juan y Cazzulo, 1976
<i>Pseudomonas</i> sp				
MC 60	48	7.8	45	Adams y col., 1975.
AFT 21	-	7.5-8.5	36	Stepaniak y Fox, 1985
AFT 36	39	-	-	Matta y col., 1994

<sup>a</sup> g: Cromatografía de filtración en gel y s: geles de poliacrilamida y SDS.

### 2.5.1. Producción de proteasas.

La mayoría de los estudios realizados indican que el máximo en la secreción de proteasas es al final de la fase exponencial y principios de la fase estacionaria (Peterson y Gunderson, 1960; Fox y Stepaniak, 1983; Bucky y col., 1987; Fairbairn y Law, 1987).

Para explicar la regulación de la síntesis de proteínas extracelulares se han propuesto dos modelos:

- a) El modelo de Coleman (1975) postula la existencia de una regulación conjunta de la síntesis de todas las proteínas celulares. Según este modelo, existe un número limitado de nucleótido y que no son suficientes durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano para que se transcriba el ARN mensajero correspondiente a la proteínas extracelulares. Hay poca evidencia a favor de este modelo y la existente se refiere a bacterias Gram-positivas (Hernández, 1991).
- b) Actualmente el modelo más aceptado es el de Harder (1979) que propone una regulación propia para las enzimas extracelulares. basada en la limitación de nutrientes. La regulación se puede ejercer mediante inducción, represión por productos finales y/o represión catabólica. En este modelo los microorganismos, en ausencia de inductor, producen niveles muy bajos de la enzima extracelular, que al actuar sobre el sustrato, dan lugar a productos de degradación de bajo peso molecular. Estos productos entran

en la célula y actúan como inductores, informando de la presencia de un biopolímero potencialmente útil, cuando no haya otros nutrientes más fácilmente utilizables (Hernández, 1991).

### ***2.5.2. Factores que intervienen en la producción de enzimas extracelulares.***

Se ha observado que las fuentes de carbono y nitrógeno juegan un papel importante en la producción de proteasas así como la adición de leche en polvo como inductor en la producción de éstas a medios de cultivo como caldo nutritivo, infusión cerebro-corazón, caldo de tripticaseína y soya, así como extracto de peptona de levadura (McKellar, 1982). Otros de los factores importantes son la temperatura (McKellar, 1982) y la aireación (García Collia y col., 1981; Fox y Stepaniak, 1983; Birkeland y col., 1985).

### ***Composición del medio.***

Este es un factor importante para la producción de enzimas. La leche es un excelente medio de crecimiento para las bacterias, su composición (aminoácidos, carbohidratos fermentables, etc.), influyen en la producción de enzimas en la misma (Fairbairn y Law, 1986). Así, se ha observado escasa producción de enzimas de *P. fluorescens* B52 a 7°C, en un medio con poca cantidad de sales suplementado con caseína isoeléctrica al 1%, o con suero al 3%. Sin embargo, la adición de suero y caseína isoeléctrica juntos tienen un efecto estimulante (Rowe y Gilmour, 1983).

La producción de proteasas está influenciada por la presencia de los siguientes agentes inductores:

- a) Diversos aminoácidos inducen la producción de proteasas por *Pseudomonas*. Por ejemplo, la asparagina es el inductor más efectivo de proteasas de *P. fluorescens* NCDO 2085, cuando se le adiciona tirosina o arginina, probables inductores, la producción de proteasas aumenta al doble (Fairbairn y Law, 1986b).
- b) Los péptidos pequeños de la leche descremada inducen la producción de proteasas por *P. fluorescens* (Mckellar, 1982). Igualmente, la caseína, la peptona bacteriológica y la leche peptonizada inducen la síntesis de proteasas de *Pseudomonas* (Juffs, 1976).
- c) La presencia de algunos componentes inorgánicos es también importante para la producción óptima de proteasas activas. Por ejemplo, el rendimiento en proteasa de *P. fluorescens* es nueve veces mayor en presencia de  $\text{CaCl}_2$  (Amrute y Corpe, 1978).

### **Temperatura.**

La temperatura óptima de producción de enzimas por unidad celular es inferior a la temperatura óptima de crecimiento microbiano. No obstante se producen niveles más altos de estas enzimas a la temperatura óptima de crecimiento debido al mayor número de células (Mckellar, 1982). Es decir, la producción de proteasas por unidad de peso seco aumenta con el

descenso de la temperatura y el rendimiento celular. Por debajo de 20°C disminuye con la disminución de la temperatura. Esta cantidad mayor de enzima a bajas temperaturas sirve para compensar la velocidad menor de la actividad enzimática y en general, de la difusión y del transporte de nutrientes (Hernández, 1991).

### **Aireación.**

La aireación es un factor importante, dado que, en casos como el de la leche fresca frecuentemente se agita de forma periódica para evitar la separación de la grasa. Aunque algunos autores sugieren un efecto similar al de la temperatura, es decir la aireación estimula el crecimiento de microorganismos, la inducción enzimática por unidad celular es mucho mayor en el cultivo no aireado que en el aireado (Alford y Elliot, 1960; García Collia y col., 1981). Otros autores han observado que la aireación estimula la acumulación de enzima en el medio (Fox y Stepaniak, 1983; Birkeland y col., 1985).

## **2.6. Regulación de la síntesis de proteasas.**

La síntesis de proteasas está sujeta a represión por la presencia de los siguientes catabolitos:

- a) Los azúcares, como la glucosa tienen efecto represor en la producción de proteasas por *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* (Juffs, 1976; Mckellar, 1982).

- b) Los ácidos orgánicos, como el láctico, también tienen efecto represor aunque menor que la glucosa y solamente cuando está presente a concentraciones elevadas (Mckellar, 1982). El succinato y el piruvato permiten la síntesis de proteasas de *P. fluorescens* (Mckellar, 1982) pero no de *P. maltophilia* (Boethling, 1975). El citrato reduce la actividad proteolítica, bien por actuar como quelante de cationes necesarios para la actividad enzimática (Richardson y Whaiti, 1978) o bien por reprimir la síntesis de la enzima (Mckellar, 1982).
- c) La urea, el amoníaco, las concentraciones altas de aminoácidos o de otros nutrientes en el medio también actúan como represores (Fairbairn y Law, 1986a).
- d) Los iones metálicos como  $Fe^{2+}$  a concentración elevada influyen negativamente en la síntesis de proteasas. Se ha demostrado que su incorporación, tanto en los medios de cultivo como en leche, inhibe la producción de estas enzimas (Fairbairn y Law, 1986a; Hernández, 1991).

Uno de los iones más importantes involucrados en la síntesis de enzimas extracelulares por psicrotrofos es el calcio. Este catión es requerido para activar las proteasas aisladas, pero en muchos casos puede estar también presente en el medio de crecimiento para incrementar la producción de la enzima (McKellar, 1989).



La función del calcio en la síntesis de proteasas extracelulares por *P. fluorescens* ha sido examinada por varios autores (McKellar y Cholette, 1984). En un estudio diseñado para evaluar la influencia de los nutrientes limitantes sobre la producción de proteasas, estos autores encontraron una reducción de la síntesis de proteasas al incrementar el ortofosfato. Otros quelantes tales como polifosfatos y EDTA evitaron la producción de la enzima sin afectar al crecimiento significativamente (McKellar y Cholette, 1985a).

Una amplia variedad de proteínas han sido usadas como fuentes de carbono y/o nitrógeno para la producción de enzimas extracelulares de psicrótrofos, entre las cuales se incluyen peptona, proteasa-peptona, triptona y ácidos casamínos. La peptona es la más efectiva en la estimulación de producción de proteasas de *P. lacrymans* (Law y col., 1977) y *P. aeruginosa* (Juffs, 1976), y de proteasas y lipasas de *P. fluorescens* (Christen y Marshall, 1984; Juffs, 1976). La triptona, es la mejor fuente de C y N para la producción de proteasas por *P. aeruginosa* (Nigam y col., 1981) y *Pseudomonas* sp. (Malik y Mathur, 1984). Los ácidos casamino y proteasa-peptona también estimulan la síntesis de enzimas en diferentes cepas de psicrótrofos (O'Reilly y Day, 1983; Whooley y col., 1983; Nashif y Nelson, 1953; Nigam y col., 1981). Los hidrolizados de caseína estimulan la producción de proteasas de *P. fluorescens* (Law y Fairbairn, 1982) y de aminopeptidasas y endopeptidasas de *Aeromonas* sp. (Litchfield y Prescott, 1970a; Litchfield y Prescott, 1970b).

También los medios de crecimiento comerciales para la síntesis de enzimas han sido estudiados. Así, las proteasas de *P. fluorescens* P26 se produjeron óptimamente en medio

infusión cerebro-corazón (BHI), mientras que el caldo de tripticaseína y soya (TSB) y caldo nutritivo (CN) fueron sustratos menos efectivos (Mayerhofer y col., 1973). En contraste, el BHI fue un medio pobre para la secreción de proteasas de otras cepas de *P. fluorescens* (McKellar, 1982). Algunos estudios mostraron que el TSB resultó ser el mejor medio, mientras la síntesis fue escasa en CN, a menos que se añadiera leche en polvo (McKellar, 1982). Algunas de las variaciones en la síntesis de enzimas extracelulares observada con diferentes medios pueden ser atribuidos a la inconsistencia en la manufactura de estos productos.

Algunas cepas de *P. fluorescens* no secretaron proteasas en CN lo cual puede ser explicado por la limitación del calcio en este medio. Por otro lado la leche es un excelente medio para la producción de enzimas extracelulares. La leche en polvo es mejor que CN para la producción de lipasas de *P. fluorescens* y consistentemente da una alta producción de proteasas cuando se compara con un medio mineral. La producción de proteasas en CN y en medio mineral puede ser estimulada por la adición de leche descremada en polvo (McKellar y Cholette, 1985b).

Poco se ha hecho por determinar las características de la leche en polvo, las cuales promueven la síntesis de enzimas extracelulares. McKellar (1982) demostró que una fracción de bajo peso molecular obtenida de la leche en polvo estimula la síntesis de proteasas de *P. fluorescens* en medio mineral. Los estudios posteriores indicaron que la habilidad como

estimulante no estaba relacionada con el contenido de aminoácidos o péptidos, sino con el contenido de calcio (McKellar y Cholette, 1985b).

Por otro lado Law y Fairbairn (1985) consideraron la posible contribución de otros componentes de la leche en polvo en la síntesis de enzimas extracelulares de *P. fluorescens*, encontraron que la presencia de péptidos y aminoácidos puede influir en la síntesis de enzimas de psicrotrofos.

Se han reportado variaciones considerables en la habilidad de diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. en la producción de lipasas y proteasas extracelulares. Sin embargo, al tratar de explicar las variaciones en la producción en función de la composición del medio, no se encuentra ningún patrón definido (McKellar, 1982).

### *2.6.1. Mecanismos de secreción de proteasas.*

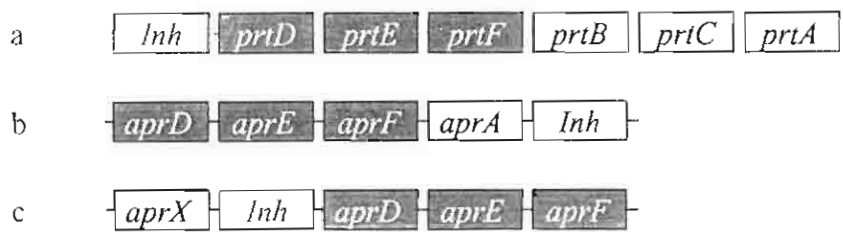
Se han descrito dos mecanismos distintos de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas. Algunas proteínas son traslocadas a través de la membrana citoplásmica por una etapa dependiente del péptido señal y después transportadas fuera de la célula por un proceso el cual frecuentemente, pero no siempre, es catalizado por una serie de proteínas de secreción específica localizadas en el entorno celular. Otros tipos de proteínas extracelulares no tienen un péptido señal y son secretadas por una ruta separada (Wandersman, 1989).

La secreción es un caso específico de exportación de proteínas. En bacterias Gram-negativas, las proteínas secretadas tienen que atravesar la envoltura celular compuesta de dos membranas distintas, separadas por un espacio periplásmico. *P. aeruginosa* constituye un caso particular debido a su habilidad a secretar diferentes proteínas, tales como lipasas, fosfolipasas, fosfatasa alcalina, exotoxina A, proteasa alcalina y elastasa (Liu, 1974; Doung y col., 1992).

En *P. aeruginosa* la secreción de la proteasa alcalina (APR) es por una ruta distinta a la de otras enzimas extracelulares. La secreción de APR depende de las proteínas de secreción específicas codificadas por genes agrupados sobre un fragmento de 5 kb de ADN adyacente al gen estructural de la proteasa (Guzzo y col., 1991b). Los análisis de secuencia del *apr* locus revelaron la presencia de tres ORFs ("Open Reading Frame"), designados como *aprD*, *aprE*, *aprF* (Doung y col., 1992).

Liao y McCallus (1998) han reportado que la cepa *P. fluorescens* CY091 produce una proteasa alcalina extracelular (AprX) con un peso molecular estimado de 50 kDa sin péptido señal, lo cual permite concluir que la traslocación de esta enzima a través de la membrana citoplásmica no está mediada por la ruta dependiente del segmento de secreción, sino posiblemente mediada por un aparato de secreción independiente consistiendo en dos proteínas asociadas a la membrana (AprD y AprE) y una asociada al periplasma (AprF). Basándose en la homología de sus secuencias, la función del aparato AprDEF de *P. fluorescens* es análoga al aparato de secreción de la proteasa o la hemolisina de *P. aeruginosa*.

*E. chrysanthemi*, y *E. coli*. Comparando la organización de los operones de los genes asociados con la producción y secreción de proteasas de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *E. chrysanthemi* se encontraron diferencias entre estas bacterias (Figura 5). En *P. aeruginosa* y *E. chrysanthemi* los genes estructurales de las proteasas están localizados después de los genes transportadores (*aprDEF* o *priDEF*). Sin embargo, en *P. fluorescens* el gen *aprX* fue localizado antes de los genes transportadores *inh* y *aprDEF*. Sin embargo, esta diferencia en la organización del operón del gen de la proteasa de estos organismos no se ha explicado (Liao y McCallus, 1998).



Fuente Liao y McCallus, 1998.

Figura 5. Organización de los operones de las secuencias de los genes de producción y secreción de proteasas de (a) *E. chrysanthemi*, (b) *P. aeruginosa* y (c) *P. fluorescens*.

Los mecanismos de secreción de proteínas en bacterias Gran-negativas, involucrando el cruzamiento de la membrana citoplásmica y de la exterior es aún desconocido (Guzzo y col., 1991).

Se sabe que la secreción de la proteasa alcalina (APR) por *P. aeruginosa* es diferente a la de otras proteínas extracelulares. Se han definido las mutaciones pleiotrópicas (*xcp*) como

una ruta general de secreción que media la secreción de diferentes proteínas, involucrando diferentes genes dispersados en el cromosoma; ninguno de los mutantes *xcp* que han sido estudiados afectan la secreción de APR. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la APR tiene su propia ruta específica, independiente de las rutas de secreción (Guzzo y col., 1991).

Guzzo y col., (1990) describieron también la clonación del gen estructural de APR (*apr*); reportando que está determinada por un fragmento de ADN contiguo de 8.8 kb, el cual contiene toda la información necesaria para la síntesis y secreción de la proteasa activa cuando ésta es expresada en *E. coli*.

## 2.7. Purificación y caracterización de proteasas de *P. fluorescens*.

La purificación de una proteína requiere de una estrategia inteligente en la selección y combinación de técnicas basadas en el conocimiento que de la proteína de interés se tiene. Ya que no existe la técnica ni el esquema de purificación que permita purificar todo tipo de proteína. Tres requisitos son necesarios para desarrollar una estrategia de purificación (Williams, 1995): 1) determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su uso posterior, 2) conocer la mayor información relacionada con fuentes y naturaleza de las proteínas de interés, así como contaminantes de la preparación biológica y 3) buscar la mejor fuente de la proteína de interés. Estos requisitos son interdependientes y a mayor conocimiento de uno, mayor la posibilidad de desarrollar una estrategia exitosa.

Las especies del género de *Pseudomonas* dominan la microflora de los alimentos refrigerados. *P. fluorescens* es el psicrótrofo de descomposición de alimentos más estudiado; sus proteasas tienen un significado adicional debido a su gran termoestabilidad. Mientras que muchos de los trabajos sobre proteasas de *P. aeruginosa* fueron llevados a cabo debido a su patogenicidad, en alimentos refrigerados su importancia también radica en su efecto deteriorante.

Se han aislado proteasas extracelulares de diversas cepas de *P. fluorescens*. Las principales características de los procedimientos de purificación, así como las características generales y su composición de aminoácidos se han reportado (Fox y col., 1989).

Peterson y Gunderson (1960) fueron los primeros investigadores en emprender los estudios sobre proteasas de *P. fluorescens*. La proteasa extracelular fue secretada durante la fase logarítmica de crecimiento; la producción máxima ocurrió a 0°C y a pH 7.0-8.5. Las fracciones obtenidas del sobrenadante libre de células (SLC) por precipitación fraccionaria con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0 a 50 % y 50 a 85% de saturación) dieron actividades diferentes de acuerdo a la temperatura aplicada sugiriendo la presencia de diferentes enzimas. La proteasa en la fracción 50-85% tuvo una temperatura óptima de 20°C comparada con la fracción de 0-50% con temperaturas mayores a 37°C. La actividad de ambas fracciones incrementó por arriba de pH 7.5 pero fue irregular a valores de pH mayores.

Posteriormente, Huley y col., (1963) purificaron parcialmente la proteasa de *P. fluorescens* 17, pero únicamente caracterizaron la actividad en SLC. La actividad fue estimulada por  $\text{Fe}^{2+}$  pero inhibida por diversos iones metálicos y por cisteína. La enzima fue inactivada en 20 s a  $70^\circ\text{C}$  pero el efecto de temperaturas superiores no fue reportado.

Si bien Kishonti y Sjöström (1970) reportaron que las proteasas de varios psicrótrofos resistieron procesos de UHT, el primer aislamiento y caracterización de una proteasa de *P. fluorescens* P26 estable al calor fue hecho por Mayerhofer y col., (1973). La enzima purificada era homogénea y muy estable al calor, lográndose la inactivación total en 8 h a  $71.4^\circ\text{C}$  o en 9 min a  $120^\circ\text{C}$ . La caseína, el suero y especialmente la leche descremada aumentan su estabilidad al calor.

La proteasa termoestable de *P. fluorescens* MC60 ha sido ampliamente estudiada por varios autores (Adams y col., 1975; Barach y col., 1976; Barach y Adams, 1977; West y col., 1978). La proteasa fue ~4000 veces más estable que las esporas de *B. stearothermophilus*, con una  $D_{120^\circ\text{C}} = 90$  s y una  $Z = 32.5^\circ\text{C}$ . Esta enzima es totalmente inactivada por EDTA y parcialmente por *o*-fenantrolina (*o*-FA); la apoenzima es parcialmente reactivada por  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$  y más eficientemente por  $\text{Zn}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$ ; ambos iones son necesarios para una estabilidad máxima. La enzima activa contiene 0.4 átomos de  $\text{Zn}^{2+}$  y 4 átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  por molécula pero no contiene cisteína.



La proteasa de *P. fluorescens* R-12 tiene una actividad máxima sobre caseína en el intervalo de pH 6.5 a 10 y no se inhibe por pCMB, pero sí por EDTA al dializar contra una solución 5 mM. Por otro lado *o*-FA 1mM causa inhibición completa, aún en la presencia de 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que tanto  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$  son el grupo prostético.  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  0.5 mM producen una reactivación leve,  $\text{Co}^{2+}$  mas  $\text{Zn}^{2+}$  producen una reactivación cercana al 100%. La proteasa es completamente inactivada en 10 min a 50°C en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM; el efecto de temperaturas mayores no es reportado (Juan y Cazzulo, 1976).

*P. fluorescens* AR-11 secreta 4 proteasas, de las cuales solo la más abundante ha sido purificada (Alichanidis y Andrews, 1977). La enzima es termoestable con una temperatura óptima de ~35°C, pero mantiene ~33% de la actividad máxima a 4°C,  $K_m$  sobre caseína es de ~0.13 mM; la inhibición por sustrato se produce a concentraciones de 0.22 mM o más. La proteasa es fuertemente inhibida por iones metálicos y parcialmente por agentes bloqueadores tiol pero no por  $\text{F}^-$  o por inhibidores de tripsina o quimotripsina, EDTA 10 mM causa una leve activación, lo cual se considera como el resultado de la quelación de iones metálicos.

*P. fluorescens* AR-11 fue renombrada *P. fluorescens* NCDO 2085 (Fairbairn y Law, 1986b) y sus proteasas posteriormente fueron purificadas y caracterizadas. El procedimiento de aislamiento incluyó cromatofoco y FPLC. En contraste con el estudio anterior (Alichanidis y Andrews, 1977), únicamente se observó una proteasa en el SLC, con características considerablemente diferentes. Esta proteasa es completamente inhibida por 1 mM de EDTA, EGTA o *o*-FA pero la apoenzima no es reactivada por 5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ .

Ba<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, aunque estos iones activan a enzimas sin tratar. PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride), inhibidor de proteasa serínica, causó solo una inhibición mínima. Los bloqueadores tiol y agentes reductores de disulfuro causan inactivación parcial. El perfil de aminoácidos difiere marcadamente de otros perfiles de proteasas de *P. fluorescens*; esta contiene cisteína y 0.5 átomos de Zn<sup>2+</sup> y 0.75 átomos de Ca<sup>2+</sup> por molécula (Fairbairn y Law, 1986b).

La proteasa de *P. fluorescens* 28 P 12 también ha sido parcialmente purificada y caracterizada (Milliere y Veillet-Poncet, 1979); hidroliza más rápidamente a  $\beta$ -caseína que a  $\alpha_s$ -caseína.

Las proteasas de 2 cepas de *Pseudomonas* aisladas de leche bronca tuvieron pH óptimo entre 7 y 8.5 mientras que las obtenidas de otras cinco cepas tuvieron pH óptimo entre 8 y 10 (Richardson y Whaiti, 1978). Las proteasas mostraron diferentes sensibilidad al EDTA lo cual parece estar directamente relacionado con la termoestabilidad (Richardson, 1981). También ha sido purificada una de estas proteasas de *P. fluorescens* B52 (Richardson, 1981). El análisis de aminoácidos de estas proteasas presentó ausencia de cisteína, la que mostró un pH óptimo de 7 y 10 fue inactivada por EDTA o *o*-FA; Co<sup>2+</sup> 5 mM reactivó a la apoenzima mientras Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup> son menos eficientes en la reactivación.

Una cepa de *P. fluorescens* aislada de agua, secreta cinco proteasas las cuales fueron purificadas y parcialmente caracterizadas (Leinmüller y Christophersen, 1982a y 1982b). La proteasa más abundante es inhibida por concentraciones altas de caseína; todas las enzimas

son activas en un amplio intervalo de pH con óptimo ~9; todas son inhibidas, en diferentes grados, por EDTA, pCMB, PMSF y iodoacetato; varias proteasas son estables a temperaturas altas pero presentan baja estabilidad a ~50°C; cuatro de estas enzimas tienen un peso molecular de 44 a 48 kDa y una de 39 kDa.

*P. fluorescens* AFT 36 secreta 3 proteasas, la más abundante fue purificada y caracterizada (Stepaniak, y col., 1982; Stepaniak y Fox, 1983) (Tabla 1). Esta proteasa tiene una temperatura óptima de actividad a 45°C pero retiene ~30% de la actividad máxima a 7°C. El  $K_m$  sobre caseinato de sodio es de 0.27 mM con una mínima inhibición por sustrato a 3 mM. La proteasa es completamente inactivada por EDTA 5 mM o *o*-FA y la apoenzima es reactivada completamente por  $Zn^{2+}$  o  $Co^{2+}$  y escasamente por  $Mg^{2+}$ ; estos iones son inhibitorios a concentraciones superiores a 10 mM. Esta proteína es termolábil en amortiguador de fosfatos pero muy estable a temperaturas mayores a 70°C en amortiguador con calcio: no perdió actividad en urea 4 M.

Patel y col. (1983a) estudiaron las proteasas termoestables de 19 cepas de *P. fluorescens*. sin embargo no reportaron los datos completos para todas ellas. Las proteasas de siete cepas son óptimamente activas a 40°C y a pH 7.2-7.4; seis cepas en su mayor parte diferentes a las siete previamente estudiadas hidrolizan mas rápidamente  $\alpha$ -caseína que  $\beta$ -caseína pero no se encontró un patrón para la hidrólisis de  $\kappa$ -caseína: la albúmina sérica bovina (ASB), ovoalbúmina y hemoglobina son levemente hidrolizadas. Las proteasas de las cinco cepas son inhibidas por  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ , pero  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  son poco

efectivos. El intervalo de pesos moleculares de las ocho proteasas es de 38 a 44 kDa; los autores reportan que una proteasa más grande, procedente de una cepa adicional tuvo un peso molecular de 75 kDa, un valor excepcionalmente grande para una proteasa de *Pseudomonas*.

La proteasa de *P. fluorescens* T-16 es totalmente inhibida por EDTA 2 mM, *o*-FA y 8-hidroxiquinoleína (Patel y col., 1983b). pCMB causa inhibición parcial pero PMSF y el inhibidor de tripsina de soya no causa inhibición. La apoenzimas es reactivada completamente por una mezcla de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  pero el efecto de otros metales no se ha reportado. Con  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  2 mM se produce una inhibición considerable de la enzima nativa pero  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  tienen poco efecto. Los caseinatos son hidrolizados en el siguiente orden: entera >  $\alpha_s$  >  $\beta$  >  $\kappa$ ; la ASB, hemoglobina y ovoalbúmina son hidrolizadas lentamente o no toda; el  $K_m$  para  $\alpha_s$ -caseína fue de 0.05 mM.

Las proteasas T<sub>25</sub> y T<sub>16</sub>, así como T<sub>20</sub> y T<sub>13</sub> fueron estudiadas posteriormente por Patel y col., (1986). Las cuatro enzimas son inactivadas por EDTA y contienen de 4 a 16 átomos  $\text{Ca}^{2+}$  por mol pero poco  $\text{Zn}^{2+}$ ; la proteasa T<sub>20</sub> contiene 4 átomos  $\text{Mg}^{2+}$  por mol. Los pesos moleculares están dentro del intervalo ya reportado para estas enzimas (40–50 kDa) aunque la composición de aminoácidos difiere significativamente de otros valores reportados. El aminoácido N-terminal fue treonina en todos los casos. El intervalo de puntos isoeléctricos es de 5.7 a 6.2.

La purificación de la proteasa de *P. fluorescens* cepa 1, aislada de pescado es inhibida por EDTA pero no por DFP y escasamente por ácido *p*-cloromercurifenilsulfónico (Damoglou y Downey, 1983). Estos autores no reportan la termoestabilidad. La proteasa purificada parcialmente de *P. fluorescens* M5 es completamente inactivada a 40°C en 60 min pero es más estable a temperaturas por arriba de 50°C; el  $\text{Ca}^{2+}$  no estabiliza la proteasa a 40°C (Marshall y Marstiller, 1981). Esta tuvo un pH óptimo excepcionalmente bajo (< 5.5).

El mecanismo de inactivación por calor fue estudiado por Diermary y col. (1984). La inactivación de la enzima por EDTA a 37°C está acompañada por una autólisis mientras la apoenzima producida por tratamiento con EDTA a 22°C puede ser reactivada por varios metales, siendo el  $\text{Zn}^{2+}$  fue el más efectivo. La sustitución de  $\text{Zn}^{2+}$  por otros metales altera las propiedades catalíticas de la enzima.

Kumura y col., (1993) purificaron una proteasa extracelular de *P. fluorescens* No. 33, el procedimiento incluyó una precipitación con HCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y cromatografía de intercambio iónico. La enzima fue purificada 170 veces dando una producción del 7% de la actividad original. El peso molecular fue de 48 kDa y el pH y temperatura óptimos en caseína fueron de 8.0-9.8 y 30-35°C respectivamente. La proteasa fue más estable en una solución salina de leche sintética que en fosfato de sodio 0.1 M, siendo termolábil en ambos sistemas de amortiguadores a 50°C. La actividad fue inhibida por *o*-FA,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y en menos medida por  $\text{Ni}^{2+}$ . La caseína fue susceptible a la proteasa, pero los patrones de degradación dependieron de las formas de la caseína.

El efecto de la temperatura sobre la secreción de proteasas en el medio fue estudiado por Margesin y Schinner (1992). Estos investigadores purificaron y caracterizaron las proteasas extracelulares de tres cepas de *P. fluorescens* (164/03, 177/30 y 165/14), reportaron que la producción mayor se dió a 10°C para la cepa 164/10 mientras que las otras dos tuvieron una alta formación de proteasa a 20°C; la más alta actividad proteolítica fue observada en la fase estacionaria de crecimiento de las tres cepas, ninguna de las cuales formó proteasas a 30°C. Las enzimas tuvieron un peso molecular entre 47 y 51 kDa, los valores pI variaron en un intervalo de 7.4 a 7.8. El pH óptimo de actividad azocaseinolítica fue entre 6-7 y la temperatura óptima entre 40-45°C. Las proteasas fueron termolábiles, perdiendo su actividad rápidamente al elevar la temperatura por arriba del óptimo pero observándose un incremento en la termoestabilidad por adición del Ca<sup>2+</sup>. El EDTA, SDS, urea, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> inhibieron fuertemente la actividad proteolítica mientras que Fe<sup>2+</sup>, Mo<sup>5+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> redujeron la actividad en un 10% en promedio. Las tres proteasas mostraron inhibición por sustrato para ciertas concentraciones de caseína (0.4-0.75%). Este patrón también ha sido observado en otras proteasas de *P. fluorescens*, para la cual un contenido de caseína del 0.5% fue inhibitorio (Alichanidis y Andrews, 1977).

#### **Aislamiento y purificación de proteasas de *P. fluorescens*.**

Con pocas excepciones los procedimientos de aislamiento han sido poco estandarizados. Muchos autores (Noreau y Drapeau, 1979; Richardson, 1984; Yan y col.,

1985) han probado fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La producción de enzima pura ha sido moderada: la cromatografía de afinidad, usada por algunos investigadores (Azcona y col., 1988), no mejoró la producción pero simplificó el procedimiento de purificación. Los procedimientos de aislamiento más sofisticados, entre los que se encuentran el cromatoenfoco y FPLC, dieron únicamente una producción de ~4% (Fairbairn y Law, 1986b).

Azcona y col. (1988) reportaron un nuevo sistema de cromatografía de afinidad para el aislamiento de metaloproteasas termoestables de *P. fluorescens* AH-70 usando gramicidin S-Sepharosa 4B; encontrando que la bacitracin Sepharosa-4B es ineficiente para este fin. La proteasa tiene un peso molecular de 33 kDa e hidroliza caseína pero no ASB.

Al determinar las características de algunas proteasas de *P. fluorescens*, han surgido algunos puntos específicos que se indican a continuación.

1. El peso molecular de la mayoría de las proteasas esta dentro del intervalo de 40 a 50 kDa (Fox y col., 1989; Margesin y Schinner, 1992; Kumura y col., 1993), la única excepción notable es la de *P. fluorescens* P26 (23 kDa) (Mayerhofer y col., 1973).
2. Cuando el peso molecular se determina tanto en solventes no disociantes como disociantes, las enzimas se encuentran como monómeros consistiendo de una sola cadena polipeptídica (Fox y col., 1989).

3. La actividad óptima se encuentra en el intervalo de temperatura de 30 a 45°C: en todos los casos, la actividad disminuye rápidamente a temperaturas por arriba de la óptima (Huley y col., 1963; Margesin y Schinner, 1992) pero todas las proteasas para las cuales hay datos disponibles retiene la actividad a 4°C (Huley y col., 1963).
4. La actividad óptima se encuentra a pH que se puede definir dentro de dos categorías: proteasas neutras con óptimo ~7 (Patel y col., 1983b; Azcona y col., 1988; Margesin y Schinner, 1992; Fernández y col., 1999) y proteasas alcalinas con pH óptimo entre 8 a 9 (Fairbairn y Law, 1986b; Mitchell y col., 1986; Kumura y col., 1993) y, en pocos casos, hasta de 10 (Richardson, 1981). Todas las proteasas son activas a pH 6 y estables a un amplio intervalo de pH (Fox y col., 1989).
5. Todas las proteasas son metaloenzimas (Fox y col., 1989) y muchas contienen 1 mol de  $Zn^{2+}$  por mol y de 1 a 8 moles de  $Ca^{2+}$  por mol (West y col., 1978; Patel y col., 1986; Fox y col., 1989). La apoenzima es parcialmente reactivada por varios metales, el  $Zn^{2+}$ , seguido por  $Ca^{2+}$  que da mejores resultados en muchos casos: el  $Zn^{2+} + Ca^{2+}$  es generalmente necesario para una reactivación óptima (Stepaniak, y col., 1982; Stepaniak y Fox, 1983). El  $Co^{2+}$  es muy efectivo en algunos casos (Richardson, 1981) y  $Mn^{2+}$  en otros (Jackman y col., 1983). En todos los casos en los que hay datos disponibles,  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  y en menor medida  $Ca^{2+}$  son inhibitorios a concentraciones altas posiblemente debido a enmascaramiento de un residuo de histidina (Fox y col., 1989). En algunos casos, los agentes bloqueadores de sulfhidrilo causan inactivación parcial a



- concentraciones altas (Fox y col., 1989); sin embargo, únicamente una proteasa (*P. fluorescens* NCDO 2085) presentó cisteína (Fairbairn y Law, 1986b).
6. Los análisis de aminoácidos muestran muy bajos niveles de metionina, bajos niveles de lisina y arginina y altos niveles de aminoácidos ácidos, hidrofóbicos y residuos menores.
  7. Los puntos isoelectrónicos varían ampliamente (5.1 a 8.8) (Fox y col., 1989).
  8. Con la excepción de la proteasa OM227 (Mitchell, y col., 1986), las proteasas de *P. fluorescens* son extremadamente termoestables pero algunas son inestables alrededor de 60°C; sin embargo, los datos de estabilidad a temperaturas altas no son reportados para todas las proteasas (Fox y col., 1989).

## 2.8. Plásmidos.

El término “plásmido” originalmente fue usado por Lederberg (1952) para describir todas las determinantes hereditarias extracromosómicas. Actualmente, el término está restringido propiamente a la replicación del ADN extracromosómico. En otras palabras, los plásmidos son elementos genéticos encontrados fuera del cromosoma en el interior de la célula, se pueden replicar automáticamente e independientemente del cromosoma, y sin embargo son considerados no esenciales para la célula, a menudo llevan a cabo funciones secundarias que son vitales para la célula bajo ciertas condiciones (Chakrabarty, 1976).

Los plásmidos están ampliamente distribuidos en los procariontes. su tamaño varía desde menos de  $1 \times 10^6$  Da hasta más de  $200 \times 10^6$  Da, es decir de 1 hasta más de 200 kpb (Couturier y col. 1988) y generalmente son dispensables. Los plásmidos se pueden clasificar en dos grupos principales – en conjugativos y no conjugativos – según lleven o no un conjunto de genes, llamados genes *tras* que promueven la conjugación bacteriana. También se pueden clasificar según se mantengan múltiples copias por célula (plásmidos relajados) o un número limitado de copias en cada célula (plásmidos restringidos). La replicación de los plásmidos restringidos va necesariamente ligada a la replicación cromosómica, de ahí el bajo número de copias. Generalmente, los plásmidos conjugativos tienen un peso molecular relativamente alto y existen de 1 a 3 copias por cromosoma, mientras que los plásmidos no

conjugativos tienen un peso molecular bajo y presentan múltiples copias por célula (Tabla 2) (Old y Primrose, 1987).

Tabla 2. Propiedades de algunos plásmidos conjugativos y no conjugativos de organismos Gram-negativos.

Plásmido	Tamaño (Mdal)	Conjugativos	Número de copias de plásmidos por equivalente cromosómico	Fenotipo
Col E1	4.2	No	10-15	Producción de colicina E1.
RSF 1030	5.6	No	20-40	Resistencia a la ampicilina.
clo DF13	6	No	10	Producción de cloacina.
R6K	25	Si	13-38	Resistencia a la ampicilina y a la estreptomycinina.
F	62	Si	1-2	—
R1	62.5	Si	3-6	Resistencias múltiples.
Ent P 307	65	Si	1-3	Producción de enterotoxina.

Fuente: Old y Primrose, 1987

### 2.8.1. Plásmidos en *Pseudomonas sp.*

Las especies de *Pseudomonas* juegan un papel clave en el ambiente, incluyendo la biodegradación de compuestos tóxicos tanto naturales como sintéticos y la interacción planta-bacteria. Una propiedad adicional de las pseudomonas, particularmente *P. aeruginosa*, es su resistencia a antibióticos. Los plásmidos controlan algunas de estas características importantes en la célula bacterianas y promueven la transferencia de información genética entre diferentes grupos taxonómicos de bacterias (Inouye, 1998).

Debido a la naturaleza patógena de la *P. aeruginosa* y su resistencia a antibióticos comunes, muchos estudios han sido dirigidos hacia el desarrollo de antibióticos que actúan contra este microorganismo (Chakrabarty, 1976). Se han encontrado cuatro tipos de plásmidos en *Pseudomonas*, el primero conocido como plásmidos resistentes a antibióticos o plásmidos-R (Tabla 3), es el responsable de la inactivación de antibióticos como gentamicina, carbenicilina, cloramfenicol, kanamicina y tobramicina (Inouye, 1998), lo cual ha provocado el surgimiento de nuevas áreas de estudio que involucran el mecanismo de evolución de plásmidos resistentes a drogas (Chakrabarty, 1976; Inouye, 1998).

Tabla 3. Plásmidos-R en *Pseudomonas*.

Grupo de
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="background-color: #e0e0e0; padding: 5px;"> <small>           3 M-Iz            Departamento Ciencias Biológicas            Universidad Nacional de Córdoba         </small> </div> <div style="text-align: right;">53</div> </div>

Plásmido	incompatibilidad	Propiedades <sup>a</sup>	Tamaño (kpb)
RP1, RP4, RK2	P1	Cb, Km, Tc, Tra <sup>-</sup>	56.6
pMG1	P2	Sm, Su, Gm, Hg, Mob <sup>+</sup>	~500
RSFG1010, R1b679	P4	Sm, Su, Mob <sup>-</sup>	8.7
pMS350	P9	Cb, Gm, Su, Tra <sup>-</sup>	49
pSa	Sin clasificar (W) <sup>b</sup>	Sp, Sm, Su, Km, Cm, Gm, Tra <sup>-</sup>	39

Fuente: Inouye, 1998.

<sup>a</sup> Abreviaturas: Cb, carbenicilina; Cm, cloramfenicol; Gm, gentamicina; Hg, ion mercurio; Km, kanamicina; Sm, estreptomycin; Sp, espectinomycin; Su, sulfonamidas; Tc, tetraciclina; Tra<sup>-</sup>, representa la habilidad de ser autotransmisible; Mob<sup>+</sup>, representa la habilidad de ser movilizado por un plásmido conjugativo.

<sup>b</sup> Grupo de incompatibilidad de enterobacterias.

El segundo tipo de plásmido es el llamado plásmido de transferencia ("sex-factor") (Chakrabarty, 1976). Tales plásmidos han sido caracterizados tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida* y han contribuido al entendimiento de la organización del cromosoma de *Pseudomonas*, estos son capaces de inicializar la transferencia de genes cromosomales de una célula a otra (Chakrabarty, 1976).

El tercer tipo encontrado en *Pseudomonas* son los plásmidos que confieren resistencia a iones metálicos, pesticidas y luz UV (Tabla 4) (Inouye, 1998.). Si bien la resistencia al mercurio está frecuentemente mediada ya sea por los plásmidos resistentes a los antibióticos o a los de transferencia, es posible caracterizar los plásmidos trasmisibles o no trasmisibles cuya

única función conocida es conferir resistencia a concentraciones tóxicas de sal de mercurio (Chakrabarty, 1976).

Tabla 4. Plásmidos codificadores de resistencia a iones metálicos, pesticidas y luz UV.

Plásmido	Fenotipo <sup>a</sup>	Fuente	Tamaño (kpb)
pMR1	Hg, Pm, As, Cd	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa MR1	146
pMERPH	Hg, IncJ	<i>P. putrefaciens</i>	ND <sup>b</sup>
pPT23D	Cu	<i>P. syringae</i>	39
pPSR1	Cu, Sm	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	68
pCMS1	Op	<i>P. diminuta</i> MG	70
pMG2	Gm, Sm, Su, Hg, Pm, UV, IncP2	<i>Pseudomonas</i> sp.	400

Fuente: Inouye, 1998.

<sup>a</sup> Abreviaturas: Gm, gentamicina; Sm, estreptomycin; Su, sulfonamidas; Hg, cloruro de mercurio; Pm, acetato de fenilmercurio; Cd, compuestos de cadmio; As, compuestos de arsénico; Cu, compuestos de cobre; Op, compuestos organofosforados; UV, ultravioleta; IncJ, grupo de incompatibilidad de plásmido J; IncP2, grupo de incompatibilidad de plásmido P2

<sup>b</sup> ND, no determinado.

El cuarto tipo de plásmidos que se encuentran en *Pseudomonas* le confiere una versatilidad metabólica única, lo cual las hace acreedoras a una variedad de funciones importantes. Algunas actividades catabólicas son especificadas por genes en plásmidos, designados como plásmidos catabólicos o degradativos (Tabla 5). Estos plásmidos se encuentran en forma natural y son tanto transmisibles como no transmisibles. Los plásmidos

catabólicos especifican un grupo de genes involucrados en la biodegradación de compuestos orgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, alcaloides y aromáticos clorinados (Chakrabarty, 1976; Sayler y col., 1990; Whyte y col., 1997).

Tabla 5. Plásmidos catabólicos en *Pseudomonas*.

Plásmido	Sustrato	Tamaño (kpb)	Fuente	Grupo de incompatibilidad	Ref. <sup>a</sup>
CAM	Alcamfor	~500	<i>P. putida</i> PpG1	P2	1
OCT	<i>n</i> -Alcanos (C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> )	~500	<i>P. putida</i> PpG6	P2	2
TOL (pWW0)	Xileno, tolueno	117	<i>P. putida</i> mt-2	P9	3
NAH (NAH7)	Naftaleno	83	<i>P. putida</i> PpG7	P9	4

<sup>a</sup>Referencia: 1: Rheinwald y col., 1973; Koga y col., 1986. 2: Chakrabarty y col., 1973; Shapiro y col., 1981. 3: Worsey y Williams, 1975; Duggleby y col., 1977. 4: Yen y Gunsalus, 1982; Yen y col., 1983.

### 2.8.2. Técnicas de curado.

La eliminación de plásmidos ("curado") de una bacteria es la mejor prueba para sustentar la relación entre un carácter genético y la carga de un plásmido específico por el cultivo (Crosa y col., 1994). Un fenotipo ligado a la presencia de un plásmido puede no expresarse en el cultivo curado. Los protocolos para curar consisten básicamente en exponer un cultivo a diferentes concentraciones de un agente químico, tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, dodecil sulfato de sodio (SDS), antibióticos o a temperaturas mayores a la

normal (Crosa y col., 1980; Hirota, 1960; Tomoeda y col., 1968.) seguido de un plaqueo y análisis de la presencia de un carácter portado por el plásmido. Las colonias que pierden el carácter son analizadas por su contenido de plásmidos para confirmar la pérdida de éstos.

### 2.8.3. Extracción y purificación de plásmidos.

Muchas de las técnicas usadas para aislar ADN plasmídico de bacterias, están basadas en la configuración superenrollada CCC (circular covalentemente cerrada) de esta macromolécula. Todas las técnicas requieren de algún tipo de lisis celular suave, y de esta forma mantener intacto el ADN plasmídico y físicamente ser separado del ADN cromosómico. Esta separación es más fácil con plásmidos pequeños, el grado de dificultad incrementa conforme aumenta el tamaño de los plásmidos como es el caso de los megaplásmidos. Esta dificultad está fundamentada en el hecho de que plásmidos muy grandes están normalmente presentes en un bajo número de copias (Old y Primrose, 1987).

Good y Nazar (1997), reportan la obtención de ADN plasmídico de alta calidad a partir de un simple lisado alcalino, por precipitación directa usando polietilenglicol (PEG). El único requerimiento para obtener el lisado clarificado es la sustitución del acetato de potasio por el acetato de sodio, lo cual da como resultado la obtención de un lisado clarificado y provee el sodio necesario para una precipitación eficaz. El PEG usado (6.5 %) es un nivel de umbral que resulta en la precipitación preferencial de ácidos nucleicos de gran tamaño, sobre



oligodesoxirribonucleótidos y ribonucleótidos como contaminantes. Bajo estas condiciones es predominantemente aislado el ADN plasmídico CCC.

La técnica reportada por Kado y Liu (1981) permite la detección y aislamiento de plásmidos de varios tamaños (2.6 a 350 megadaltons) los cuales se encuentran en especies de *Agrobacterium*, *Rhizobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. El método permite la caracterización del ácido desoxirribonucleico (ADN) CCC, el cual es liberado por las células bajo condiciones que desnaturalizan al ADN cromosómico mediante el uso de SDS (pH 12.6) a temperaturas elevadas. Las proteínas y desechos celulares son eliminados por extracción con fenol-cloroformo. Bajo estas condiciones, la concentración del ADN cromosómico se reduce o elimina. De esta forma el extracto clarificado es usado directamente para análisis por electroforesis en geles de agarosa.

El Kit Midipreps (Boletín Técnico No. A7640. Kit Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps, DNA Purification System, Promega. Madison. E. U. 1998.) consiste en una extracción por lisis alcalina y una posterior purificación del ADN por cromatografía de adsorción o intercambio iónico.

## 3. Objetivos.

---

### 3.1. Objetivos Generales.

- Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas* sp. C61 y *P. fluorescens* B52.
- Determinación de la presencia de plásmidos en las cepas de *Pseudomonas* y su correlación con la síntesis de proteasas.
- Identificación de las cepas de *Pseudomonas* sp. por medio de la determinación del porcentaje de homología de la secuencia del gen ARNr 16S con secuencias patrón del género *Pseudomonas*.

### 3.2. Objetivos Particulares.

- Optimización de la producción de proteasas de *Pseudomonas* sp.C61 y *P. fluorescens* B52 mediante la adición de compuestos inductores al medio de cultivo base.
- Separación y purificación a las proteasas mediante métodos cromatográficos (gel de intercambio hidrofóbico y filtración en gel e intercambio iónico) y isoelectroenfoque.

- Determinación del efecto de pH, temperatura, iones metálicos divalentes e inhibidores sobre la actividad proteolítica, así como la determinación de las constantes de reacción enzimática ( $K_m$  y  $I_{50\%}$ ).
- Eliminación de plásmidos ("curado") de las dos cepas de *Pseudomonas* mediante el tratamiento con agentes químicos (naranja de acridina y SDS), y tratamiento físico (crecimiento a altas temperaturas).
- Extracción y purificación de plásmidos de las dos cepas de *Pseudomonas*.
- Amplificación y secuenciar del gen ARNr 16S de las dos cepas de *Pseudomonas* mediante el uso de oligonucleótidos selectivos para *Pseudomonas* sp.
- Determinación del porcentaje de homología de la secuenciación del gen ARNr 16S con respecto a secuencias patrón de cepas tipo del banco de secuencias de la EMBL.

## 4. Metodología.

---

El Trabajo experimental se dividió en las siguientes etapas:

- Optimización de la producción de proteasas de *Pseudomonas* sp.
- Purificación de proteasas.
- Caracterización de proteasas.
- Eliminación de plásmidos (curado).
- Identificación de las cepas de *Pseudomonas* por determinación del porcentaje de homología del gen ARNr 16S con cepas tipo.

Las cepas utilizadas para este estudio fueron *Pseudomonas* sp. C61, aislada de carne de res en el laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas de la UAM-Iztapalapa (México, D. F.) y *Pseudomonas fluorescens* B52 proporcionada por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Queen's de Belfast (Irlanda del Norte).

*Producción de proteasas:* A cada una de las muestras se le eliminó la fracción celular por centrifugación a 12000 rpm por 4 min y se determinó la actividad enzimática por duplicado por el método reportado por Kunitz (1947), se utilizó como sustrato caseína (Hammarsten: Research Organics Inc. Cleveland, Ohio) al 1% con  $\text{CaCl}_2$  2 mM en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. En el Anexo II (Tabla 14) se muestra la relación de volúmenes para cada muestra. se incubaron en un baño con temperatura controlada a 37 °C durante 2 h. La reacción se detuvo al añadir 750  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) (Baker) al 5% y se centrifugó a 12000 g por 8 min a 4°C para eliminar la proteína insoluble en ácido. Los péptidos solubles en TCA se determinaron a 280 nm. Se determinó concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985) empleando un sistema BCA Protein Assay Reagent (Pierce and Warriner, Chester, Inglaterra, boletín No. 23225) de acuerdo con las especificaciones establecidas por el proveedor, se utilizó albúmina sérica como estándar (Redinbaugh y Turley, 1986).

*Detección de proteasas por medio de geles de poliacrilamida-SDS para sustrato:* Los extractos enzimáticos con mayor actividad proteolítica fueron preparados para su análisis por electroforesis. La muestra se diluyó 1:4 con amortiguador muestra sin  $\beta$ - mercaptoetanol ( $\beta$ -MCE). Se prepararon geles verticales discontinuos de 8 x 10 x 0.07 cm, de 10% de acrilamida para el gel de separación y de 4% para el gel de concentración, se empleó un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab celi de Bio-Rad (Reichmond, California, E. U.). No se aplicó a la muestra ningún tratamiento térmico. Se inyectó un volumen de 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra y 10  $\mu\text{l}$  del marcador de pesos moleculares. El análisis se llevó a cabo a corriente

constante de 15 mA por gel, aproximadamente por 1.5 h. Para mantener la temperatura baja, la cámara se colocó en el interior de un refrigerador a una temperatura de 4°C. Después del desarrollo de la electroforesis los geles se desmontaron y se sometieron a una etapa de impregnación de sustrato mediante la inmersión en una solución de caseína al 2% en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5 previamente enfriada, donde se mantuvieron por un periodo de 30 minutos a 4°C permitiendo la difusión de la caseína al interior del gel, posteriormente se realizó la etapa de incubación elevando la temperatura a 30°C para aumentar la actividad de las proteasas. Este periodo de incubación fue de hasta 2 h. Posteriormente los geles se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato y en un solo paso se fijaron y tñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 (LKB Bromma, Francia) 0.1% durante 2 h, se destñeron durante 1 h con solución de metanol (Baker) 40%–ácido acético (Baker) 10%. Este tiempo de revelado fue el necesario para obtener un buen contraste de las zonas bioactivas.

Una vez revelados los geles se colocaron en agua destilada para evitar que se siguieran destñendo. Los geles fueron barridos en un densitómetro. Se calcularon los pesos moleculares de las bandas claras con respecto a la curva patrón del Log PM contra  $R_f$ , se empleó un densitómetro Ultrascan XL (Pharmacia LKB, Bromma, Suiza).

## 4.2. Purificación de proteasas.

Basándose en los resultados obtenidos de la etapa de optimización de la producción de proteasas, se prosiguió a la producción, separación y purificación de las proteasas. En esta etapa se propusieron métodos cromatográficos de baja presión como de intercambio iónico, filtración en gel y isoelectroenfoque, previa una purificación parcial del extracto crudo por precipitación con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  0 a 65% de saturación a 0-4°C (Lara Calderón, comunicación personal). Las etapas de purificación se analizaron por electroforesis para sustrato en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones no desnaturizantes (García-Carreño y col., 1993).

Para cada producción de proteasas a partir de cada cepa se preparó 1 L de TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM, se repartió en alícuotas de 100 mL en matraces bafleados de 500 mL los cuales fueron inoculados al 1% con un inóculo con densidad óptica de 1 ( $\lambda_{660 \text{ nm}}$ ) y se incubó por 48 h a  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm, posteriormente se eliminó la fracción celular por centrifugación a 16300 g por 25 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman J2-MJ con rotor JA-14 (Palo Alto, California, E. U.), el sobrenadante obtenido se sometió a una segunda centrifugación a 16300 g por 20 minutos. Para la precipitación de las proteasas se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se calculó la cantidad de sulfato de amonio para saturar al 65%, esta etapa se realizó entre 0-4°C con agitación suave y constante, la adición de la sal se realizó lentamente para evitar la formación de espuma y de zonas de alta saturación. Una vez terminado la

adición de sal se agitó por 20 minutos y se almacenó en refrigeración durante la noche para su equilibrio. La fracción insoluble fue colectada por centrifugación a  $7600\text{ g}$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (rotor JA-20) y resuspendida en 40 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

Para la purificación por isoelectroenfoque, se partió de caldo libre de células el cual se sometió a liofilización para su secado en un equipo FreeZone 4.5 L (Labconco Kansas City, Missouri, E. U.) posteriormente el liofilizado se colocó en bolsas selladas al vacío y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### *4.2.1. Cromatografía hidrofóbica.*

Para llevar a cabo la separación por cromatografía hidrofóbica, se empleó una columna de  $45 \times 1.5\text{ cm}$  empacada con una matriz de Phenyl-Sepharosa CL-4B (Pharmacia-LKB, Bromma, Suiza), la cual se equilibró con 2 volúmenes de cama de una solución de Tris-HCl 50 mM con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.8 M y  $\text{CaCl}_2$  2 mM pH 7.5 previamente filtrado por una membrana Millipore (Bedford, Massachusetts, E. U.) de  $0.45\ \mu\text{m}$  y desgasificado por 15 minutos. Una muestra de 12 mL del extracto enzimático, obtenido por precipitación, se dializó contra la solución de equilibrio por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  con un recambio de la solución. La muestra, una vez dializada, se filtró por una membrana Millipore de  $0.45\ \mu\text{m}$  y 10 mL del filtrado se inyectaron a la columna, eluyendo con 150 mL de la solución de equilibrio (adsorción) y después con 150 mL de agua desionizada filtrada y desgasificada (desorción) a una velocidad de  $0.3\ \text{mL}/\text{min}$ , recolectando fracciones de 3 mL. A los picos obtenidos en la etapa de adsorción y desorción



se les determinó proteína y actividad proteolítica, por los métodos de BCA y Kunitz, respectivamente, según se indicó anteriormente.

#### ***4.2.2. Cromatografía de filtración en gel.***

Para llevar a cabo la filtración en gel se utilizó una columna de 95 x 2.5 cm con una matriz de Sephaeryl S-100-HR (Sigma Chemical, Co., Saint Luis, Missouri) con un intervalo de fraccionamiento de 1000–100000 Da. se equilibró con 2 volúmenes de cama con una solución de Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  5 mM pH 7.5 el cual fue filtrado por membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y desgasificado por 15 minutos. Previamente, 11 mL del extracto enzimático obtenido por precipitación, fueron dializados contra la misma solución de equilibrio a 4°C durante 24 h con un recambio de la solución, posteriormente el dializado fue filtrado a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , se inyectaron 10 mL y se eluyó con 500 mL de la solución de equilibrio a una velocidad de 0.45 mL/min colectando fracciones de 3.5 mL. A los picos recolectados se les determinó proteína por BCA y actividad proteolítica por Kunitz.

#### ***4.2.3. Cromatografía de intercambio iónico.***

La separación por cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo mediante un gradiente salino lineal con NaCl 0.5 M. Para el extracto enzimático de C61 se generó un gradiente de 0 a 0.33 M con una velocidad de 0.46 mM/min y de 0 a 0.4 M para B52 con una

velocidad 0.56 mL/min. Se empleó una columna de 45 x 1.5 cm empacada con una matriz de DEAE A (Sigma Chemical, Co., Saint Luis, Missouri) con un volumen de cama de 65.3 mL. Se equilibró la columna con 4 volúmenes de cama (261.2 mL) con una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5, el cual previamente fue filtrado por membrana Millipore de 0.45 µm y desgasificado por 15 minutos. Una muestra de 4 mL de extracto enzimático fue dializada contra la misma solución de equilibrio a 4°C durante 24 h con un recambio de la solución, posteriormente el dializado fue filtrado a través de una membrana Millipore de 0.45 µm, se inyectaron 3 mL y se eluyó con el gradiente salino en la solución amortiguadora de equilibrio a una velocidad de 0.4 mL/min colectándose fracciones de 4 mL. El gradiente lineal se inició a partir de la segunda fracción. A las fracciones colectadas de los picos se les determinó proteína por BCA y actividad proteolítica por Kunitz.

#### 4.2.4. Isoelectroenfoque.

*Preparación de muestra:* Se pesaron 3.6 g de muestra liofilizada y se disolvieron en 50 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> 2 mM, Tritón N-100 0.4%, se dejó agitando durante la noche en refrigeración. Posteriormente se dializó durante 24 h a 4°C contra la misma solución de resuspensión con dos recambios de 0.5 L cada 12 h.

Una vez acondicionada la muestra, se prosiguió a preparar la mezcla de inyección en las siguientes proporciones: a 55 µL de la muestra se le adicionaron 3 µL de solución de antolitos (pH de 3 a 10) x 2.5 µL de glicerol (el glicerol evita la precipitación de proteínas)

Una vez homogenizada la muestra en su totalidad fue inyectada en la cámara de isoelectroenfoque, previamente enfriada a  $-5^{\circ}\text{C}$  mediante un sistema de enfriamiento con recirculación, empleando como solución de enfriamiento anticongelante comercial (previamente enfriado) manteniendo la temperatura en el sistema entre  $-15$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ . El análisis se realizó a 14 watts (constante) y a una temperatura de salida del refrigerante de la cámara entre  $-2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de análisis estuvo en función del voltaje y miliamperaje, es decir, una vez que se estabilizaron estos dos parámetros por 10 min, se analizó por otros 30 min y posteriormente se detuvo (aproximadamente entre 3 y 4 h), inmediatamente después se colectaron las fracciones. A cada una de las fracciones obtenidas se les determinó actividad proteolítica por el método de Kunitz y pH. Las fracciones sin actividad fueron mezcladas para obtener un volumen total. Solamente 1 mL de éste volumen fue dializado en conjunto con las fracciones que presentaron actividad enzimática por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  contra una solución de Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  2 mM pH 7.5 con dos recambios de 0.5 L.

A las fracciones dializadas se les determinó la concentración de proteína por el método de BCA, así como actividad proteolítica por el método de Kunitz (1947). Fueron también analizadas en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes (enzimografía).

### 4.3. Caracterización de proteasas.

Las fracciones con actividad enzimática fueron mezcladas obteniendo un volumen total de cada extracto enzimático. Se prosigió a caracterizar a estas enzimas en función a los parámetros que se describen a continuación.

#### 4.3.1. *pH óptimo y estabilidad a pH.*

El efecto del pH sobre la actividad enzimática fue evaluado por incubación de cada enzima (0.5 mg/mL) a 37°C por 30 min, a diferentes valores de pH con soluciones amortiguadoras conteniendo hemoglobina o caseína como sustratos, de acuerdo a la Tabla 15 (Anexo II). La reacción fue detenida por la adición de 750  $\mu$ L de solución de TCA 5%, seguido de una centrifugación de la mezcla a 4000 rpm por 10 min, el sobrenadante obtenido se sometió a una segunda centrifugación de rectificación en viales de 1.5 mL. Posteriormente los péptidos solubles en TCA, como resultado de la proteólisis, fueron determinados a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, California, E. U.).

La estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH (intervalo de 2.8 a 12.3), fue evaluada mediante la incubación de 200  $\mu$ L de enzima (0.6 mg/mL) más 400  $\mu$ L de las diferentes soluciones amortiguadoras 0.1 M que se muestran en el Tabla 16 (Anexo III) a 4°C

por 24 h, obteniendo una concentración final de enzima de 0.2 mg/mL. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de los diferentes tratamientos.

#### 4.3.2. Temperatura óptima y termoestabilidad.

La temperatura óptima de las proteasas se determinó incubando cada una de las enzimas (en una concentración de 0.5 mg/mL) en caseína (0.5% en Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  3 mM pH 7.5) a diferentes temperaturas (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C) por 30 min.

La termoestabilidad de la enzima fue determinada por incubación de alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de enzima en viales de 1.5 mL, a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C; la incubación a 100°C se realizó en baño de aceite) por 30 min. Inmediatamente después del tratamiento térmico las muestras fueron enfriadas en agua de hielo y posteriormente se determinó la actividad enzimática en caseína (0.5% en Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  3 mM pH 7.5) a 37°C por 30 min.

#### 4.3.3. Efecto de iones e inhibidores.

Para conocer el efecto de iones metálicos divalentes e inhibidores, se dializaron 4 mL de cada extracto enzimático (0.6 mg/mL) vs. 0.5 L de Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 durante 24 h a 4°C con el fin de eliminar los iones de calcio contenidos en las muestras enzimáticas. Los

iones metálicos empleados fueron compuestos clorados ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ , y  $\text{NiCl}_2$ ) a concentraciones de 1, 5 y 10 mM y únicamente el ión cobre fue usado como sulfato ( $\text{CuSO}_4$ ) a concentraciones de 1, 2 y 3 mM. Los inhibidores de proteasas probados fueron ácido etilendiamintetraacético (sal disódica de EDTA), *o*-fenantrolina y  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -MCE) a concentraciones de 1, 5 y 10 mM, así como dodecil sulfato de sodio (SDS) a concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25% y urea a concentraciones de 1, 2, 3 y 4 M. Posteriormente, a 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático se le añadieron los volúmenes calculados para obtener las diferentes concentraciones finales de iones e inhibidores a probar (Tabla 17, Tabla 18, Tabla 19 del Anexo II). Inmediatamente los diferentes tratamientos fueron incubados a 20°C por 30 min, se determinó la actividad enzimática reactivamente tanto del control como de los tratamientos. Las soluciones de caseína 0.5% a las diferentes concentraciones de iones e inhibidores fueron previamente preparadas a partir de soluciones patrón como se indica en las Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19 (Anexo II).

#### 4.3.4. Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

Se preparó una solución de caseína 0.5% (5 mg/mL) en Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM pH 7.5, con la cual se obtuvieron las concentraciones de 0.1 a 1 mg/mL. La concentración de la enzima se mantuvo constante a 0.5 mg/mL. La actividad se determinó a 2, 4, 6, 8 y 10 min a las diferentes concentraciones. Las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  se calcularon a partir del doble recíproco de la gráfica de Lineweaver y Burk

#### 4.4. Eliminación de plásmidos (Curado).

El curado de las dos cepas de *Pseudomonas* se llevó a cabo como lo describen Crosa y col. (1994) con algunas modificaciones, que consistieron en aplicar temperatura alta, tratamiento con naranja de acridina y SDS.

##### 4.4.1. Incubación a temperatura alta.

Se inocularon 2 mL de medio TSB - NaCl 1% con 20  $\mu$ L de un cultivo fresco, incubándose a 42 °C y 200 rpm por 24 h.. El cultivo fresco se obtuvo por inoculación de 5 mL de medio TSB con una asada de una colonia aislada de la cepa a propagar, posteriormente se incubó a 20°C a 200 rpm por 15 h (condiciones experimentales). Se usaron 0.01 mL de este cultivo como inóculo para 1 mL del mismo caldo, y se incubó a 37 °C y 200 rpm por otras 24 h. Este procedimiento se repitió por 10 veces. Se realizaron diluciones de  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-14}$  con medio TSB y se extendió 100  $\mu$ l en placas con medio TSA suplementado con NaCl al 1%, incubando a 25°C. Las colonias aisladas se inocularon por contacto en placas de leche descremada en polvo al 2%, incubándose a 25°C por 48 h o hasta la formación de un halo de hidrólisis.

#### 4.4.2. Intercalado de colorantes (naranja de acridina).

Para la manipulación del colorante se usaron guantes y material desechable (puntas, cajas petri y viales)

Se inoculó 0.5 mL de caldo L (Anexo I) en viales de 1.5 mL con 20  $\mu$ L de un cultivo fresco. Se añadió a cada vial el colorante naranja de acridina, incrementando la concentración en un intervalo de 10 a 300  $\mu$ g/mL como se indica en la Tabla 20 (Anexo II).

Los viales se incubaron por 24 h a 20 °C a 200 rpm, y se seleccionó el cultivo con mayor concentración de colorante en el cual se observó el crecimiento. Se diluyó el cultivo a  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  con caldo L y se aplicaron 100  $\mu$ L en placas de agar L, incubando a 25 °C para obtener colonias aisladas. Estas se inocularon por contacto en placas de leche en polvo al 2%, incubando a 25°C por 48 h o hasta la formación de un halo de hidrólisis.

#### 4.4.3. Incubación en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS).

Se inoculó con 20  $\mu$ L de un cultivo fresco un volumen de 2 mL de TSB conteniendo 10% de SDS. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Terminado el tiempo de incubación se realizaron diluciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  y se aplicaron 100  $\mu$ L de cada dilución en placas de medio TSA para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 25 °C



Las colonias aisladas se inocularon por contacto en placas de leche en polvo al 2%, incubando a 25°C por 48 h o hasta la formación de un halo de hidrólisis.

#### 4.4.4. Pruebas con antibióticos (antibiograma).

Para determinar la efectividad de los tratamientos de curado se probaron 5 antibióticos a los cuales las *Pseudomonas* son resistentes (Chacrabarty, 1976; Liao y McCallus, 1997). Se prepararon placas de TSA con diferentes concentraciones de antibiótico por separado (Tabla 6), una placa testigo sin antibiótico y una placa de caseína al 2% para determinar la producción de proteasas. Se seleccionaron 9 colonias aisladas obtenidas tanto por el tratamiento con naranja de acridina como con SDS 10% y 8 colonias obtenidas por altas temperaturas y una colonia de cada cepa sin tratamiento de curado. En cada placa se inoculó por contacto cada colonia seleccionada de los diferentes tratamientos mediante palillos despuntados y estériles (se utilizó un palillo para cada colonia). En la Figura 6 se muestran las áreas de inoculación de las colonias para las diferentes concentraciones de antibiótico y sin antibiótico.

Tabla 6. Lista de antibióticos empleados y sus concentraciones

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Tetraciclina	25
Cloramfenicol	30
Ampicilina	100
Kanamicina	50
Rifampicina	100

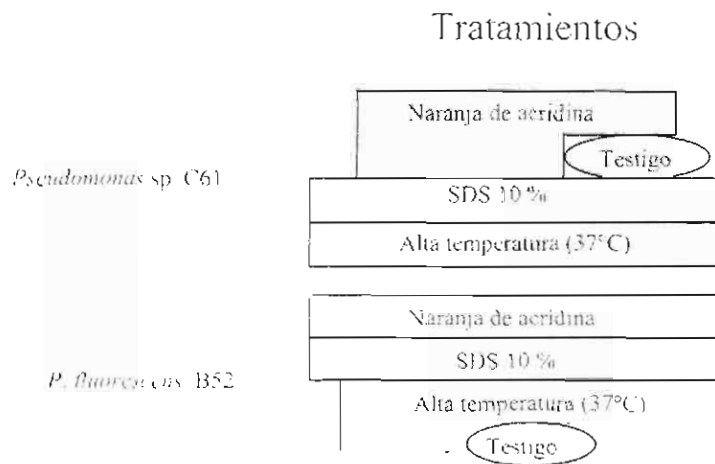


Figura 6. Areas de inoculación en placas de los diferentes tratamientos de curado y testigo.

#### 4.5. Extracción y purificación de plásmidos.

En la extracción y purificación de plásmidos, tanto de las cepas originales como de las curadas se probaron 3 técnicas: un sistema Midipreps (Wizard Plus Midipreps, DNA Purification System, Promega, Madison, E. U.) que consistió en una extracción por lisis alcalina y una posterior purificación del ADN por resina de intercambio iónico, una Minipreparación de ADN plasmídico (Sambrook y col., 1989) y un procedimiento rápido para detección y aislamiento de plásmidos grandes y pequeños (Kado y Liu, 1981) con algunas modificaciones.

La minipreparación de ADN plasmídico y el Sistema Midipreps, se llevaron a cabo como se indica en el Anexo III.

#### 4.5.1. Procedimiento rápido para detección y aislamiento de plásmidos grandes y pequeños.

Este procedimiento, descrito por Kado y Liu (1981), permite la detección y aislamiento de plásmidos de varios tamaños (2.6 a 350 megadaltons) los cuales se encuentran en especies de *Agrobacterium*, *Rhizobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, y *Xanthomonas*. El método permite la caracterización del ácido desoxirribonucleico (ADN) CCC, el cual es liberado por las células bajo condiciones que desnaturalizan del ADN cromosómico, mediante el uso de SDS (pH 12.6) a temperaturas elevadas. Las proteínas y desechos celulares son eliminados por extracción con fenol-cloroformo. Bajo estas condiciones la concentración del ADN cromosómico es minimizada o eliminada. De esta forma el extracto clarificado es usado directamente para análisis por electroforesis. El procedimiento se describe en el Anexo III.

#### Extracción de ADN cromosómico.

Las cepas se inocularon en 10 ml. de medio TSB, a 25 °C por 20 h en agitación (200 rpm). La fracción celular se separó por centrifugación a 13000 rpm por 10 min. y el precipitado de células se resuspendió en 1 mL de una solución de sacarosa 0.5 M y Tris 50 mM pH 8.0. Posteriormente se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de una solución de

EDTA 5 mM y Tris 50 mM pH 8.0, se añadieron 5 µl de RNasa de una solución patrón de 10 mg/mL y 70 µL de proteinasa K de una solución patrón de 300 mg/mL en sarkosyl 16%. Se mezcló suavemente y se incubó a 45°C por 40 min; se adicionaron 100 µL de SDS al 10%, se mezcló suavemente. Se realizaron 2 extracciones con fenol saturado, mezclando un volumen igual de fenol enfriado en hielo seguido de centrifugación a 12000 rpm por 5 min. Se recolectó la fase superior usando una pipeta Pasteur de polietileno estéril de boca ancha. El ADN se congeló a -20°C hasta su uso.

#### 4.6. Identificación de las dos cepas de *Pseudomonas* por determinación del porcentaje de homología del gen ARNr 16S con cepas tipo.

La preparación del cultivo se realizó en dos etapas, cada una de las cepas se propagaron en 10 mL de medio TSB a 20°C por 18 h a 150 rpm; posteriormente se preparó una dilución del cultivo 1/20 en 10 mL de TSB fresco a 20°C y se incubó por 3 h a las mismas condiciones. El cultivo obtenido se sometió a la etapa de extracción de ADN.

##### 4.6.1. Aislamiento de ADN.

Las células fueron obtenidas por centrifugación a 12000 rpm por 10 min. La fracción celular fue lavada y resuspendida en 1 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0)-sacarosa 0.5 M. Las células fueron transferidas a un tubo Eppendorf y centrifugadas a 12 000 rpm por 1 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en la misma solución amortiguadora conteniendo lisozima (25 µL de una solución de 50 mg/mL). La solución fue incubada a 37°C por 30 min en un baño con temperatura controlada y posteriormente centrifugada a 12 000 rpm por 1 min. Las células fueron resuspendidas en 0.5 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 8)-EDTA 5 mM, se añadieron 2.5 µL de una solución de 10 mg/mL de ARNasa y 35 µL de una solución de proteinasa K (solución de 10 mg/mL en sarkosyl al 1.6%). La solución se incubó a 45°C por 50 min, seguido de la adición de 50 µL de una solución al 10% de sarkosyl, mezclando suave pero minuciosamente, en este punto se detectó la clarificación de la preparación. Se

realizaron dos extracciones con fenol por mezclado con un volumen igual de fenol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (0.5 mL) y se agitó hasta la obtención de una emulsión, la cual fue centrifugada a 13000 rpm por 10 min. Posteriormente, mediante una pipeta Pasteur desechable de polietileno de boca ancha se tomó la fase acuosa superior, evitando tomar la interfase y el precipitado, y se transfirió a un tubo Eppendorf. La muestra de ADN se dializó por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  contra 500 mL de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)-5 mM EDTA. Las muestras se analizaron mediante la aplicación de 10  $\mu\text{L}$  de producto en geles de agarosa al 1% (condiciones de análisis: 75 volts por 2 h 30 min). Las muestras de ADN se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.2. Amplificación del gen ADNr 16S.

Para la amplificación del gen ADNr 16S que codifica para ARNr 16S de *Pseudomonas* se usaron un par de oligonucleótidos iniciadores (primers) selectivos para *Pseudomonas* (Ps-PC) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Paisley, Inglaterra) (Widmer y col., 1998). Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos selectivos para el género *Pseudomonas*.

Oligonucleótido	Secuencia
Ps-for (20-mer)	5' GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT 3'
Ps-rev (18-mer)	5' TTA GCT CCA CCT CGC GGC 3'

Los reactivos para la reacción de amplificación se añadieron a tubos Eppendorf estériles de 0.5 mL en el orden que se muestra en la Tabla 21 (Anexo II).

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, E. U.). La mezcla de reacción se calentó por 5 min a 95°C para desnaturalizar completamente el ADN. Las condiciones de las etapas de desnaturalización, alineación y polimerización de los ciclos se muestran en la Tabla 22 (Anexo II).

Las muestras fueron mantenidas a 4°C. El producto de la amplificación (amplicon) fue purificado mediante un sistema Wizard PCR Preps (Promega, Madison, E. U.) de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante para desalinizar y eliminar oligonucleótidos en exceso. Las muestras (10 µL) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (75 volts constante por 2 h 30 min) y teñido con una solución de bromuro de etidio por 30 min (Sambrook y col., 1989).

### **Secuenciación del gen ADNr 16S.**

La secuenciación del gen ADNr 16S fue determinado con un sistema secuenciador de ADN (DNA-Sequencing Kit, Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Biosystems, Warrington, Inglaterra). Los 4 oligonucleótidos iniciadores usados para una total secuenciación del fragmento, aproximadamente una longitud de 990 pb, se enlistan en la Tabla 8, y en la Figura 7 se esquematiza las zonas complementarias de unión de las cadenas sencillas



de ADN 16S con los oligonucleótidos y las direcciones de amplificación. Los ciclos de secuenciación fueron llevados a cabo en un Termociclador DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, E. U.) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante. La alineación de las secuencias obtenidas se realizaron con el paquete Sequence Navigator versión 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, California). Posteriormente las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias del fragmento ARNr 16S de *Pseudomonas* del banco de secuencias del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (European Molecular Biology Laboratory: EMBL) para obtener el porcentaje de homología.

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen ADNr 16S.

Oligonucleótido	Secuencia
Ps-for (20-mer)	5' GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT 3'
Ps-rev (18-mer)	5' TTA GCT CCA CCT CGC GGC 3'
Ps-for-2 (19-mer)	5' GAT ACC CTG GTA GTC CAC G 3'
Ps-rev-2 (19-mer)	5' CGT GGA CTA CCA GGG TAT C 3'

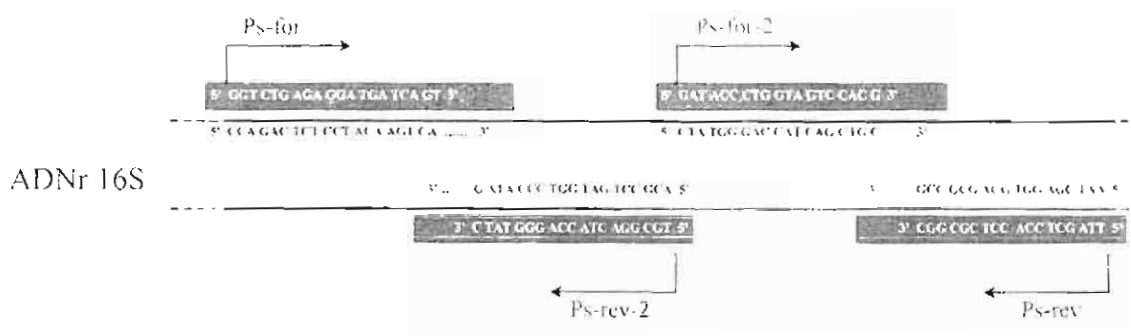


Figura 7. Zonas de unión de los oligonucleótidos iniciadores y dirección de amplificación del segmento de ADNr 16S.

## 5. Resultados y Discusión.

### 5.1. Optimización de la producción de proteasas de *Pseudomonas* sp.

#### 5.1.1. Efecto de medio base y suplementado sobre el crecimiento.

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Para optimizar la producción de proteasas por las cepas de pseudomonas se utilizaron 3 medios base: caldo tripticaseína y soya (TSB), caldo infusión cerebro corazón (BHI) y caldo nutritivo (CN), los dos primeros medios son efectivos en la síntesis de proteasas de *Pseudomonas* (McKellar, 1982), mientras que en CN la producción de proteasas puede ser estimulada si se adiciona al medio leche descremada en polvo (LD) (McKellar, 1982; McKellar y Chollette, 1985b), y como inductores  $\text{CaCl}_2$  (1, 3 y 5 mM) y LD (0.2 y 0.4%). Para cada microorganismo se realizó una cinética de crecimiento y se determinó la actividad proteolítica en los diferentes tratamientos por 48 h. Las cinéticas de crecimiento de las dos cepas de pseudomonas presentaron el mayor crecimiento en TSB y BHI (tanto en medio base como suplementado) (Figura 8, 9, 12 y 14 respectivamente). El análisis de varianza (Anexo II [Tabla 23]) con prueba múltiple de Duncan indicó que el tratamiento con mayor crecimiento se dió en TSB con 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  para ambas cepas ( $P > 0.0001$ ), siendo el medio CN con y sin inductor el de menor crecimiento (Figura 10 y 13), se

observó también un menor crecimiento en todos los medios suplementados con leche descremada en polvo 0.4%, probablemente provocado por la turbidez impartida por LD a esta concentración, es decir, al utilizar el medio con LD (blanco) no se puede establecer la densidad óptica precisa del crecimiento microbiano, dado que esta opacidad va disminuyendo durante el crecimiento como resultado de su utilización.

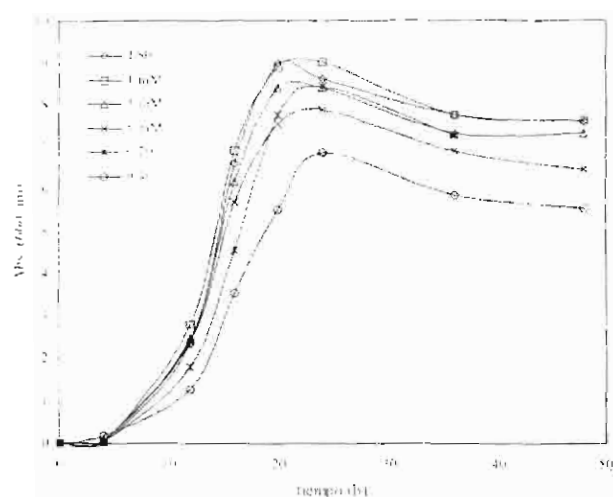


Figura 8. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en tripticaseína y soya (TSB) (◇); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (□); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

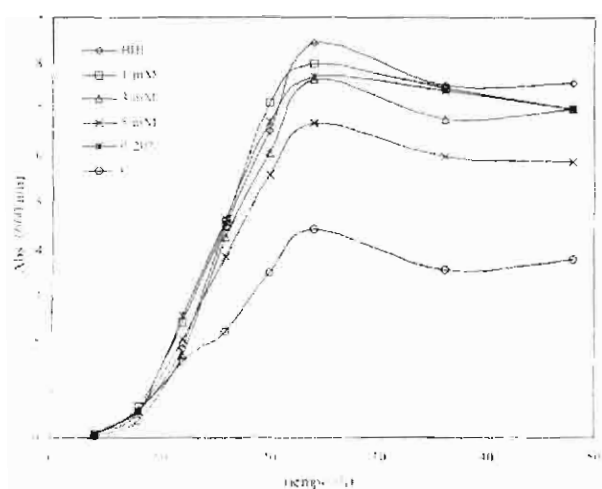


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◇); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (□); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

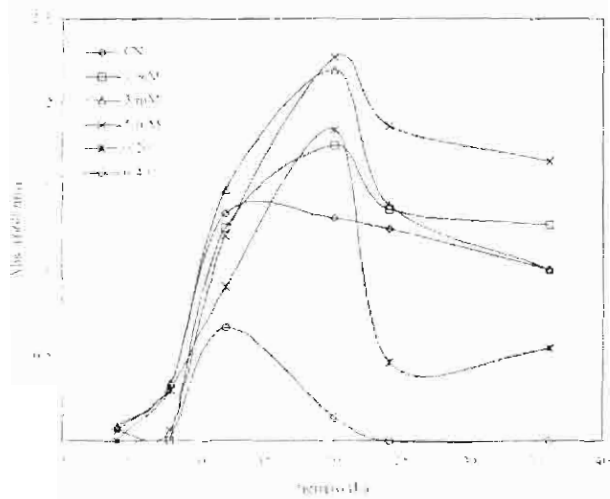


Figura 10. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◇); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (□); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

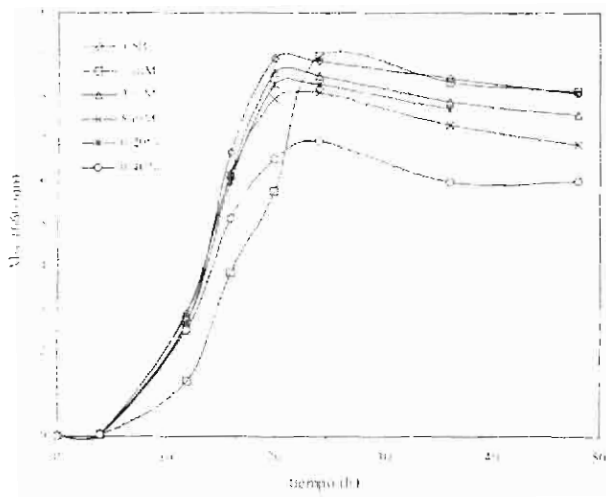


Figura 11. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

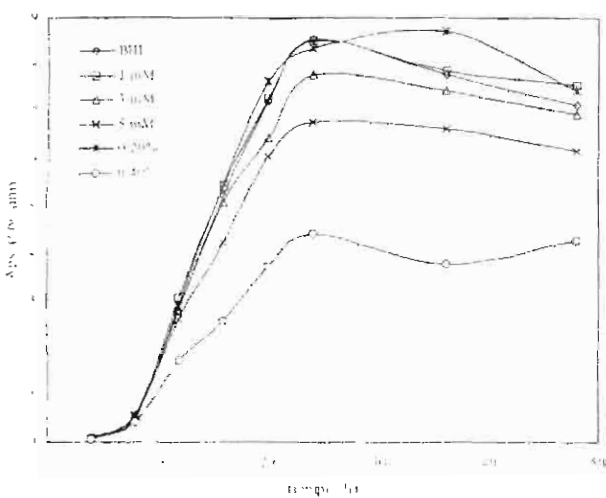


Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

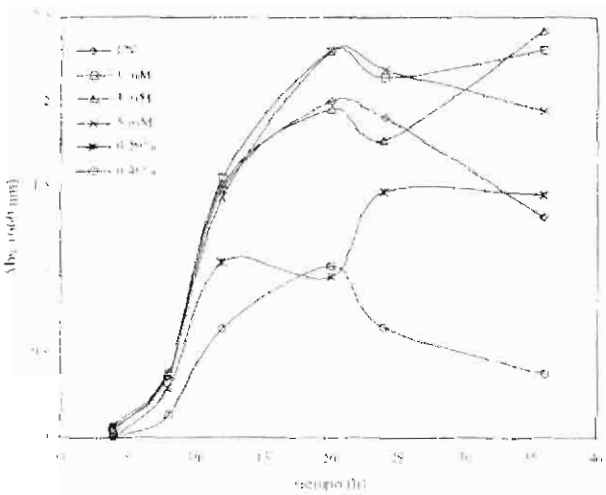


Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

### 5.1.2. Efecto de medio base y suplementado sobre la actividad proteolítica.

Debido a que la producción de proteasas extracelulares en las pseudomonas, está asociada al crecimiento esta ocurre en la parte final de la fase exponencial y principios de la fase estacionaria del crecimiento como resultado de la limitación de nutrientes, siendo una ventaja para estos microorganismos (Kohlmann y col., 1991). Este comportamiento fue observado en las dos cepas estudiadas en esta tesis con una mínima actividad proteolítica a las 16 h (final de la fase exponencial) y una máxima actividad a las 24 h (principio de la fase estacionaria). Este comportamiento ha sido reportado para otras cepas de *Pseudomonas* (Peterson y Gunderson, 1960; McKellar, 1982; Murray y col., 1983; Fox y Stepaniak, 1983; Lucky y col., 1987; Fairbairn y Law, 1987; Myhara y Skura, 1989).

La actividad proteolítica, como una medida indirecta de la producción de proteasas, se incrementó por la presencia de los inductores, teniendo los valores más altos en el medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM para ambas cepas de pseudomonas ( $P < 0.0001$ ; Tabla 23 del Anexo II) (Figura 14 y 17), siendo la *Pseudomonas* C61 la que presentó la mayor actividad proteolítica ( $P < 0.0001$ ); el efecto inductor de la LD sobre la producción de proteasas se observó en mayor medida en el medio BHI con LD 0.4% (Figura 15 y 18) pero siendo este menor que el tratamiento del medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM. En el medio CN se observó el efecto inductor del  $\text{CaCl}_2$  y LD (Figura 16 y 19), siendo favorecida la producción por LD más que con  $\text{CaCl}_2$ . Se ha reportado que la presencia  $\text{Ca}^{2+}$  es requerida para la actividad óptima de la proteasa y

para la producción de niveles altos de la enzima. Por otro lado, en la producción de la proteasa el requerimiento de calcio es específico y depende de su concentración (Lia y McCallus, 1998).



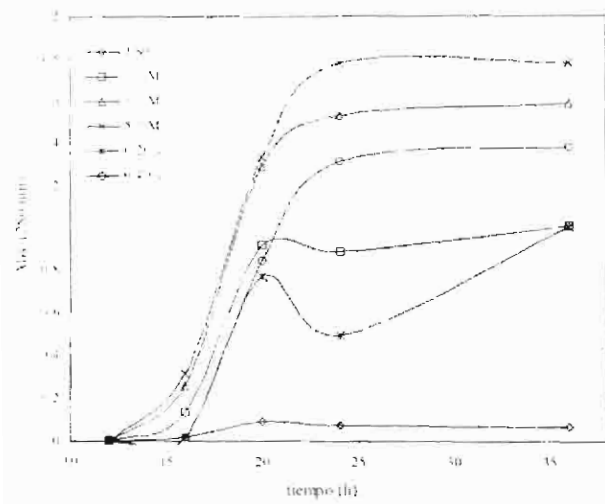


Figura 14. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en tripticaseína y soya (TSB) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

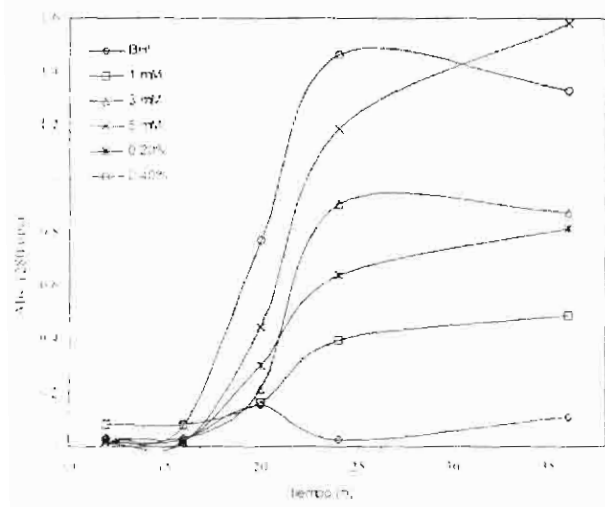


Figura 15. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

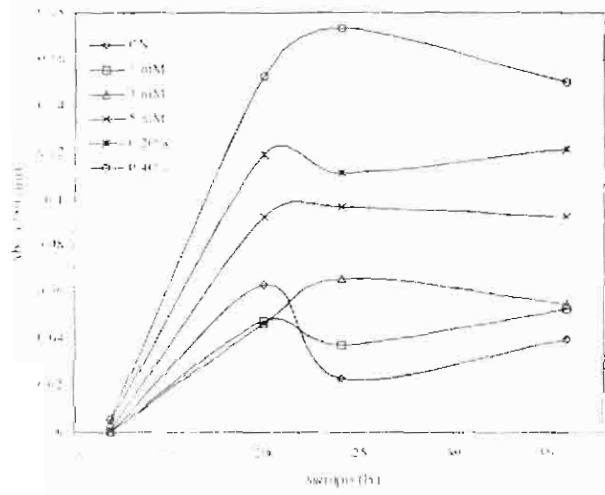


Figura 16. Actividad proteolítica de *Pseudomonas* C61, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

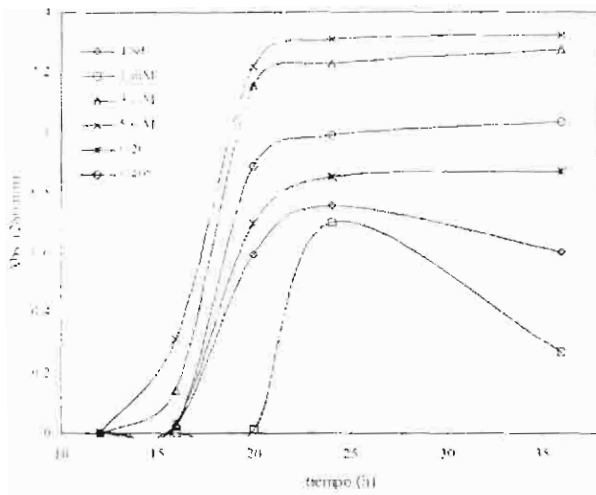


Figura 17. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52 C61, a 19°C. 200 rpm en caldo tripticaseína y soya (TSB) (◊), suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

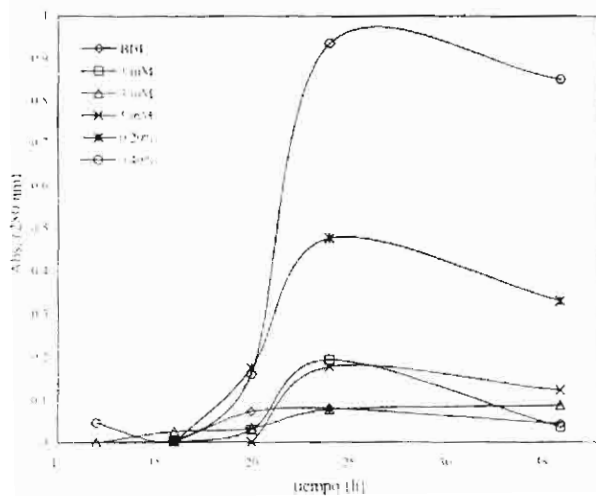


Figura 18. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52, a 19°C. 200 rpm en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

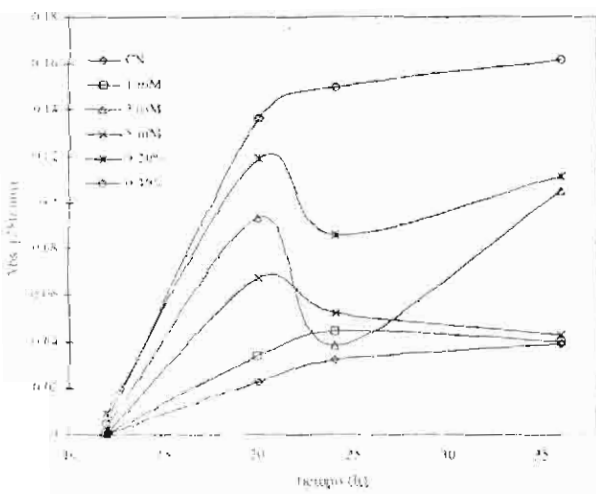


Figura 19. Actividad proteolítica de *P. fluorescens* B52, a 19°C, 200 rpm en caldo nutritivo (CN) (◊); suplementado con: CaCl<sub>2</sub> 1 mM (◻); CaCl<sub>2</sub> 3 mM (Δ); CaCl<sub>2</sub> 5 mM (x); Leche en polvo 0.2% (\*); y Leche en polvo 0.4% (O).

En las Figura 20 y 21 se muestran los geles de poliacrilamida-SDS para sustrato que presentaron la mayor actividad proteolítica. Todos los extractos de *Pseudomonas* C61 (Figura 20) presentaron una sola banda bioactiva con un peso molecular de 45 kDa lo que permitió suponer que se estaba produciendo una sola proteasa. Sin embargo en etapas posteriores de purificación y analizando con esta misma técnica, se observó la presencia de más bandas bioactivas de menor peso molecular. En cuanto a la electroforesis de los extractos de *P. fluorescens* B52 (Figura 21), ésta mostró la presencia de otras proteasas además de la principal, con un peso molecular de 48 kDa. En investigaciones realizadas sobre la producción de una proteasa de una cepa psicrófila de *P. fluorescens*, Margesin y Schinner (1992) encontraron que la proteasa producida por esta cepa formó múltiples bandas en geles de isoelectroenfoque (IEF). Estos autores sugieren que estas bandas representan diferentes formas o degradación de una sola proteasa. Reportes similares los formularon Liao y McCallus (1998) para una proteasa producida por *P. fluorescens* CY091.

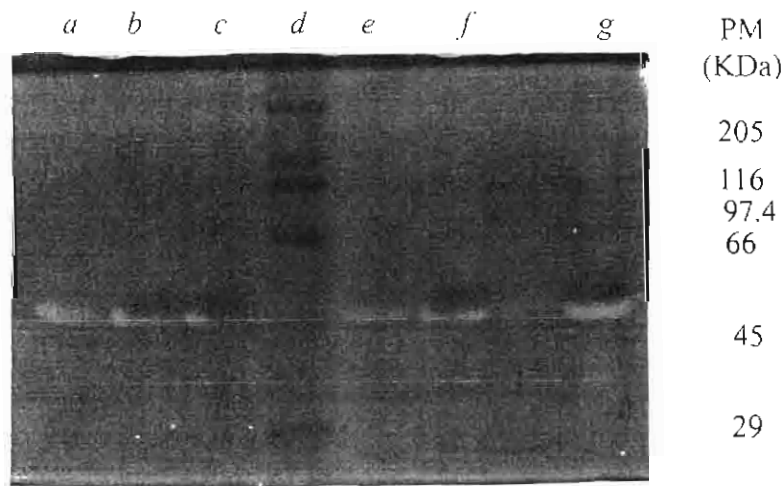


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato de extractos enzimáticos de *Pseudomonas* C 61 producidos en los diferentes medios: a) medio BHI; b) medio BHI

con  $\text{CaCl}_2$  5 mM; c) medio BHI con leche descremada en polvo 0.4%; d) Marcador de peso molecular; e) Medio TSB; f) Medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  3 mM; g) Medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM.

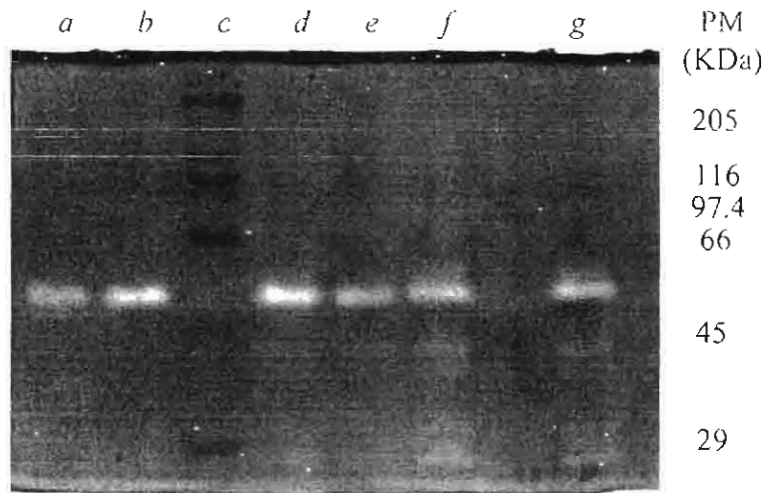


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato de extractos enzimáticos de *P. fluorescens* B52 producidos en los diferentes medios: a) medio BHI; b) medio BHI con leche descremada en polvo 0.2%; c) Marcador de peso molecular; d) Medio BHI con leche descremada en polvo 0.4%; e) Medio TSB; f) Medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM; g) Medio TSB con leche descremada en polvo 0.4%.

## 5.2. Producción y purificación de proteasas.

La producción de proteasas para ambas cepas se llevó a cabo en el medio TSB con  $\text{CaCl}_2$  5 mM, ya que en este medio suplementado se observó mayor actividad proteolítica. Para la purificación se utilizaron técnicas de cromatografía de interacción hidrofóbica y filtración en gel, así como también cromatografía de intercambio iónico y isoelectroenfoque.

### 5.2.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica.

En la Figura 22 se muestra el perfil de elución en Phenyl-Sepharosa CL-4B (Pharmacia-LKB, Bromma, Suiza) de la muestra impura del extracto enzimático de *Pseudomonas* sp. C61 obtenida por saturación al 65% con sulfato de amonio. El pico con actividad proteolítica obtenido en el ensayo sobre caseína se localizó entre las fracciones 30 a la 38 de la etapa de desorción, por lo cual la aplicación del gradiente en la primera etapa (adsorción) permitió la eliminación de proteína contaminante. La columna Phenyl-Sepharosa CL-4B (Pharmacia-LKB, Bromma, Suiza) incrementó solo 4.7 veces (Tabla 9) la pureza sobre la obtenida por precipitación con sulfato de amonio y con un rendimiento menor al 1% lo que indicó una pérdida de actividad durante la elución, debido a la sensibilidad de la enzima a la ausencia de calcio durante la elución (McKellar, 1989). El perfil de elución del extracto enzimático impuro de *P. fluorescens* B52 obtenido por saturación al 65% con sulfato de amonio se muestra en la Figura 23. Presentó un perfil similar al del extracto enzimático de *Pseudomonas* C61, localizando el pico de actividad entre las fracciones 27 y 37 de la etapa de desorción eluida con agua desionizada con un máximo en la fracción 35, mostrando un incremento en la purificación de 31.6 veces (Tabla 10) con respecto a la muestra original y solo 3 veces sobre la obtenida por precipitación con sulfato de amonio.

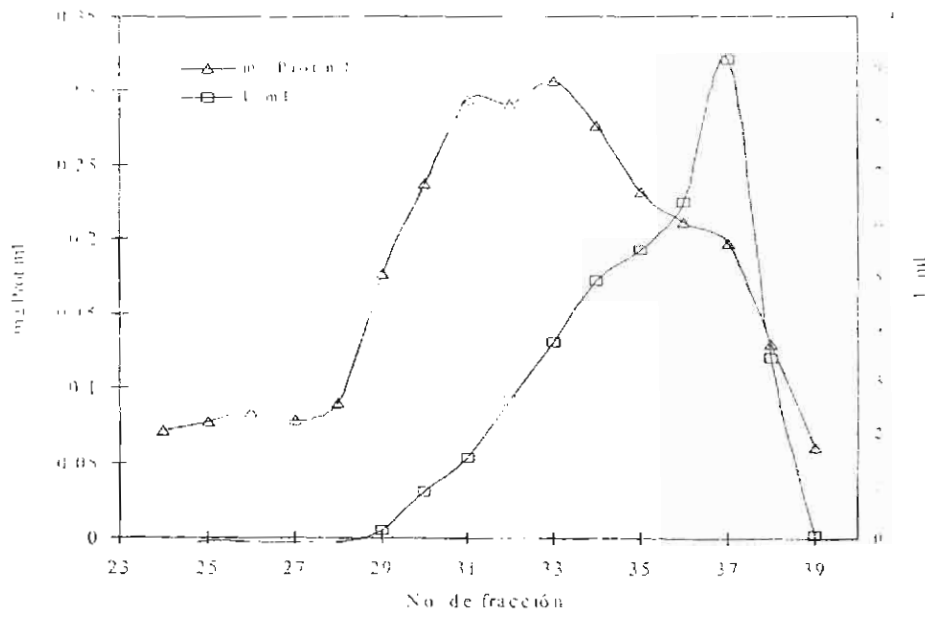


Figura 22. Purificación parcial de proteasas de *Pseudomonas* sp. C61 en Phenyl-Sepharosa CL-4B. mg Prot/mL (Δ); unidades enzimáticas (◻).

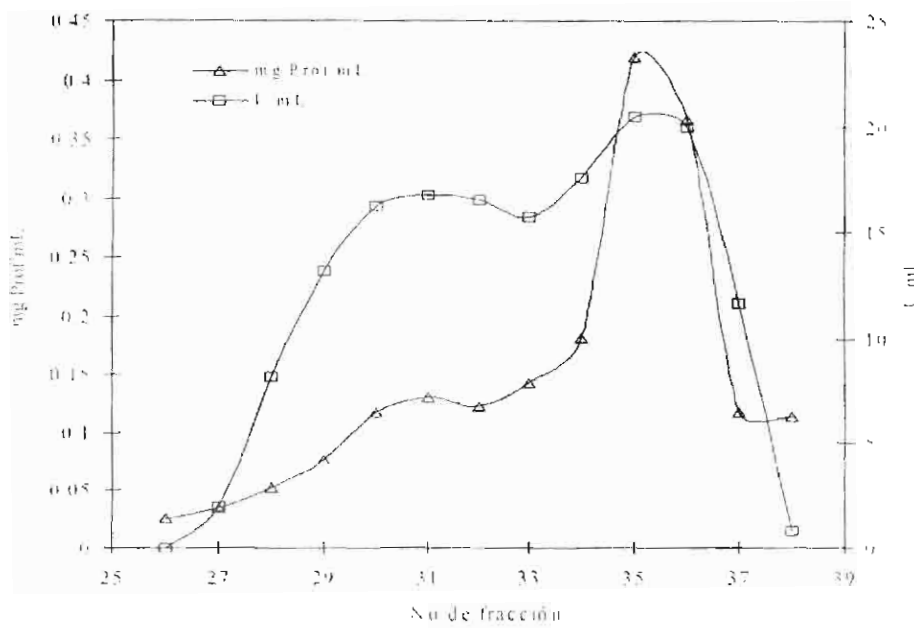


Figura 23. Purificación parcial de proteasas de *P. fluorescens* B52 en Phenyl-Sepharosa CL-4B. mg Prot/mL (Δ). unidades enzimáticas (◻).

### 5.2.2. Cromatografía de filtración en gel.

La Figura 24 muestra el perfil de elución en Sephacryl S-100-HR (Sigma Chemical Co., Saint Luis, Missouri, E. U.) del extracto enzimático impuro de *Pseudomonas* sp. C61, el pico con actividad proteolítica fue localizado entre las fracciones 62 y 71 con un máximo en la fracción 67 al eluir con Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  5 mM pH 7.5. Esta columna incrementó la pureza 35.4 veces (Tabla 9) con respecto a la muestra original, 22 veces con respecto a la muestra obtenida por saturación con sulfato de amonio y 7.4 veces mayor al obtenido por intercambio hidrofóbico. La Figura 25 muestra el perfil de elución de la muestra de *P. fluorescens* B52, localizando un pico con actividad proteolítica entre las fracciones de 62 a 70, con un máximo en la fracción 64. Se obtuvo un incremento en la pureza de 29 veces con respecto a la muestra original y 9.6 veces con respecto a la muestra obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio (Tabla 10).

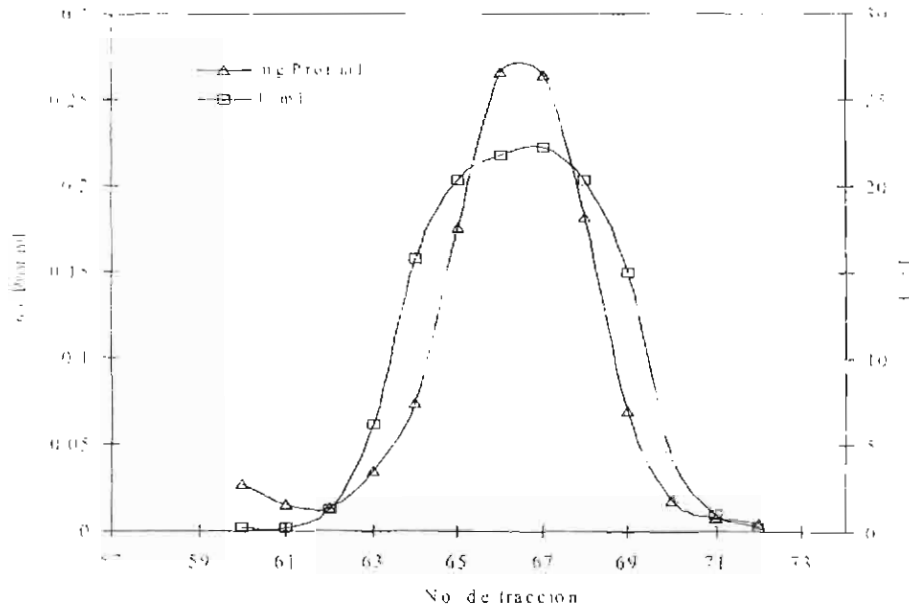


Figura 24. Purificación parcial de proteasas de *Pseudomonas* sp. C61 en Sephacryl S-100-HR.  
 mg Prot/ml (Δ); unidades enzimáticas (□).

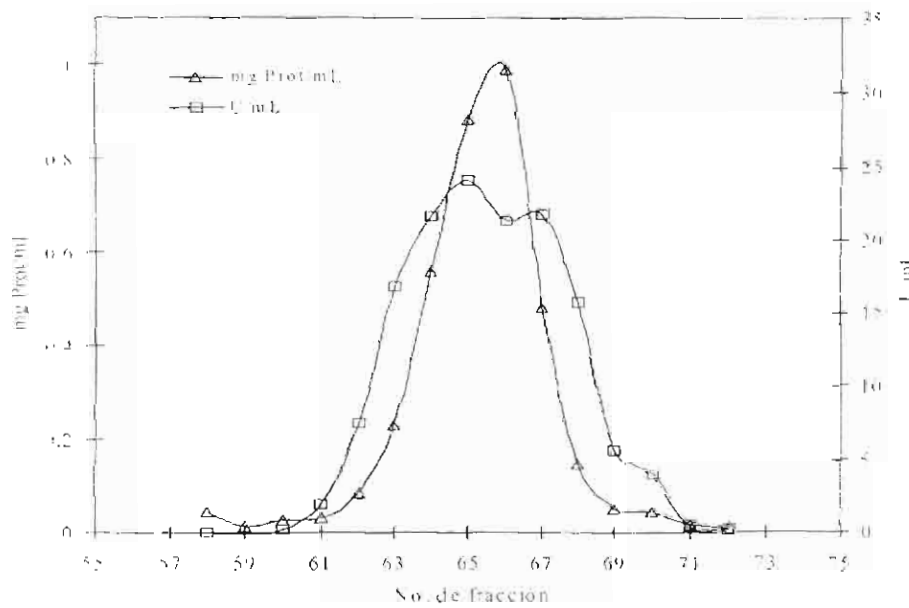


Figura 25. Purificación parcial de proteasas de *P. fluorescens* B52 en Sephacryl S-100-HR.  
 mg Prot/ml (Δ); unidades enzimáticas (□).



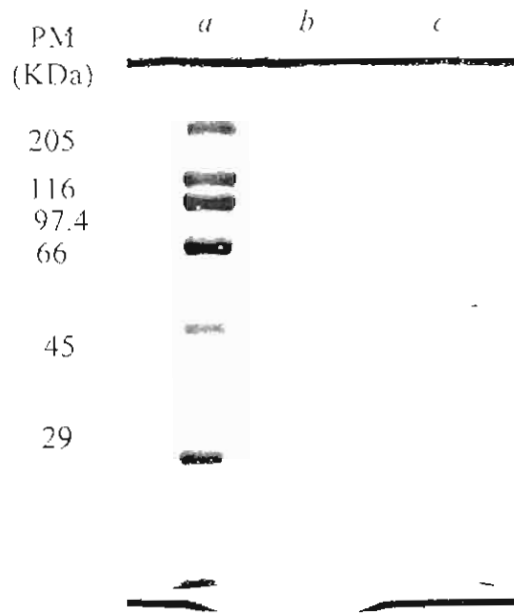
Tabla 9. Purificación de proteasa de *Pseudomonas* sp. C61.

Procedimiento	Vol. (mL)	Actividad (U/mL)	Total (U)	Proteína (mg/mL)	Act. Esp. (U/mg Prot)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
TSB-CaCl <sub>2</sub> 5 mM	925	19.851	18322.5	3.583	5.541	100.0	1.0
Resuspensión ppt 0-65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	26.164	1046.6	2.932	8.923	5.699	1.610
Cromatografía de interacción hidrofóbica	24	3.576	84.1	0.132	26.506	0.458	4.784
Cromatografía de filtración en gel	31	24.964	73.9	0.127	196.346	4.214	35.436

Tabla 10. Purificación de proteasa de *P. fluorescens* B52.

Procedimiento	Vol. (mL)	Actividad (U/mL)	Total (U)	Proteína (mg/mL)	Act. Esp. (U/mg Prot)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
TSB-CaCl <sub>2</sub> 5 mM	860	14.9272	12837.39	4.1962	3.557	100	1
Resuspensión ppt 0-65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	28.776	1151.04	2.73	10.541	8.966	2.963
Cromatografía de interacción hidrofóbica	36	17.583	632.97	0.156	112.603	4.931	31.654
Cromatografía de filtración en gel	35	32.167	1125.83	0.312	103.155	8.770	28.998

### 5.2.3. Isoelectroenfoque.



#### 5.2.4. Cromatografía de intercambio iónico.

La Figura 26 muestra el perfil de elución del extracto enzimático de C61 en DEAE A. Esta matriz, la dietilaminoetil (DEAE), es un intercambiador aniónico débil empleado para purificar proteínas cargadas negativamente (anión). La enzima de C61, con carga neta negativa, fue adsorbida por los grupos ionogénicos de la matriz, cargados positivamente, a concentraciones de sal de 0.0 a 0.15 M, mientras que la etapa de desorción fue a concentraciones de NaCl entre 0.16 y 0.2 M. La enzima eluyó entre las fracciones 36 a la 42. Aun cuando no se obtuvieron picos separados, se obtuvo un pico de actividad simétrico. En cuanto al extracto enzimático de B52 (Figura 27), la etapa de adsorción de la enzima fue entre 0.0 y 0.14 M de NaCl y eluyó a concentración entre 0.15 y 0.18 M. La enzima se obtuvo entre las fracciones 26 y 29.

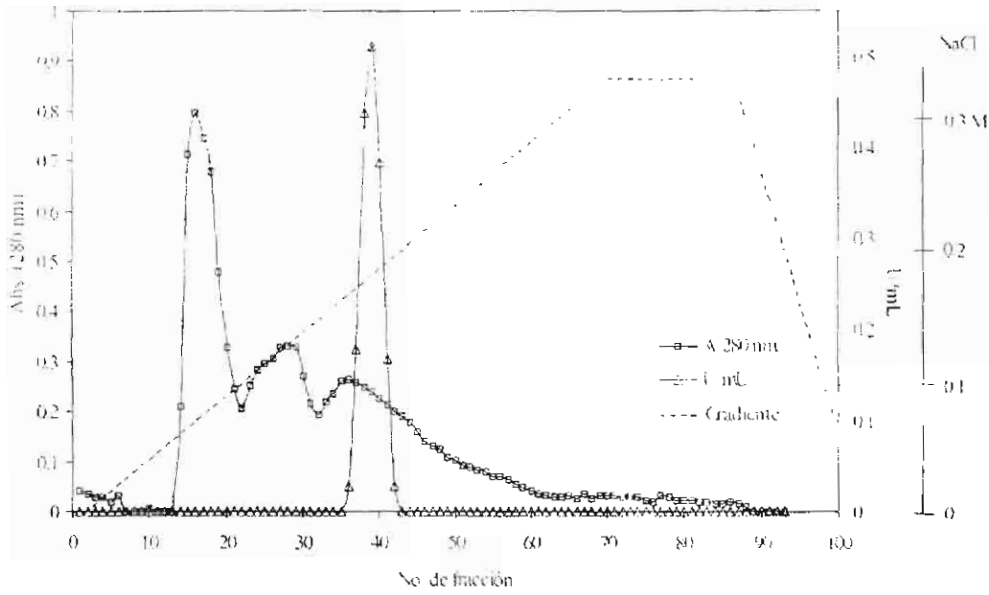


Figura 26. Purificación parcial de proteasas de *Pseudomonas* sp. C61 en DEAE A. Absorbancia a 280 nm (—); unidades enzimáticas ( $\Delta$ ); gradiente de NaCl (----).

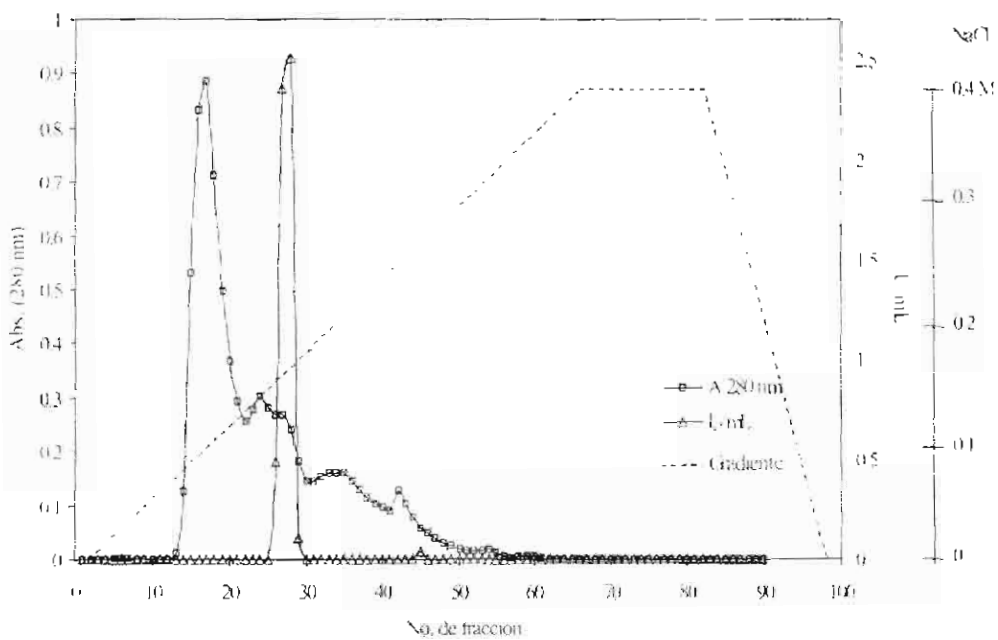


Figura 27. Purificación parcial de proteasas de *P. fluorescens* B52 en DEAE A. Absorbancia a 280 nm (—); unidades enzimáticas ( $\Delta$ ); gradiente de NaCl (----).

### 5.3. Caracterización de proteasas.

#### 5.3.1. pH óptimo y estabilidad al pH.

El pH óptimo de las proteasas se obtuvo determinando la actividad enzimática en un intervalo de pH entre 4 y 11 a 37°C por 30 min en presencia de caseína como sustrato. La proteasa de C61 presentó un máximo de actividad a pH 8.0 (Figura 28), siendo esta actividad del 95% a pH 7.5 con respecto a la actividad máxima y una pérdida de actividad del 99% a pH 10. La proteasa de B52 presentó más del 93% de su actividad máxima dentro del intervalo de pH entre 7 y 9 (Figura 28), con un máximo a pH 9 y manteniendo el 70% de actividad a pH 10, disminuyendo su actividad en un 65% a pH 11 con respecto al máximo de actividad. Richardson (1981) reportó que la proteasa de *P. fluorescens* B52 presentó una actividad máxima a pH 7 pero mantuvo el 70% de su actividad en un amplio rango de pH (6.0-10.5), clasificándola como proteasa alcalina; este autor explica que este amplio intervalo se debe probablemente a que la caseína a pH neutro puede estar presente en forma de un agregado de alto peso molecular y puede disociarse en monómeros al incrementarse el pH, aumentando así la disponibilidad del sustrato a pH mayores. Se han reportado proteasas de pseudomonas que tienen una actividad máxima alrededor del pH neutro (Alichanidis y Andrews, 1977; Stepaniak y col., 1982; Patel y col., 1983b; Azcona y col., 1988; Margesin y Schinner, 1992; Kohlmann y col., 1991; Lu y Chang, 1996), así como proteasas alcalinas (Boethling, 1975).

Richardson, 1981; Kobayashi y col., 1985; Stepaniak y Fox, 1985; Fairbairn y Law, 1986b; Mitchell y col., 1986; Kumura y col., 1993; Oh, y col., 2000). Las proteasas de las dos cepas estudiadas tuvieron un comportamiento de proteasas alcalinas.

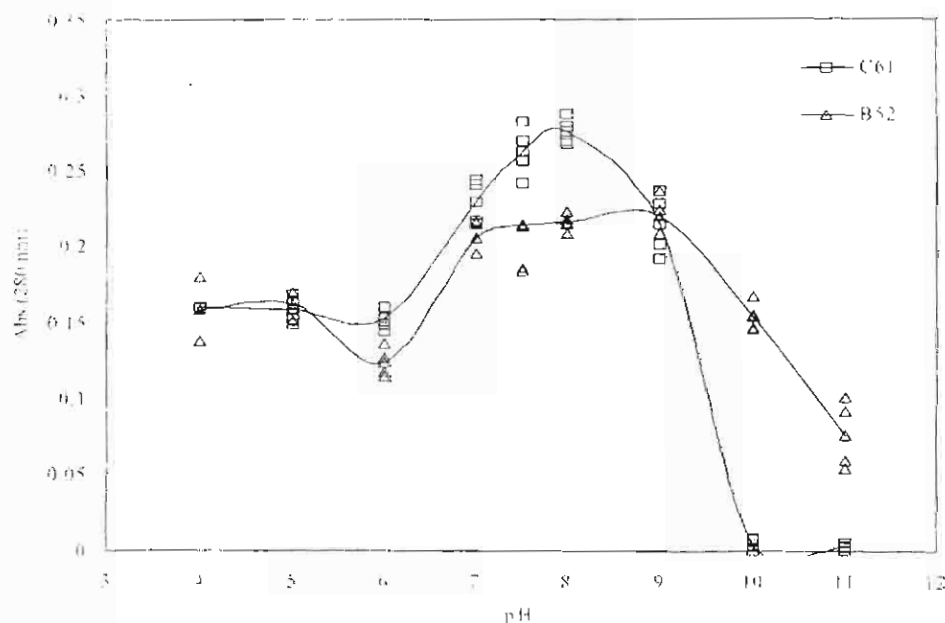


Figura 28 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la proteasa de *Pseudomonas* sp. C61 (□) y *P. fluorescens* B52 (Δ).

La estabilidad de las dos proteasas estudiadas a diferentes valores de pH (2.8 a 12.2) se obtuvo mediante la incubación de la enzima a 4°C por 24 h en diferentes soluciones amortiguadoras y posterior determinación de la actividad. Las dos proteasas presentaron alta estabilidad en un amplio intervalo de pH de 3.6 a 10 (Figura 29). La proteasa de C61 a pH de 11.3 perdió el 95% de su actividad, mientras la proteasa de B52 fue más estable, manteniendo un 51% de actividad aun a pH 11.6 con respecto a la actividad máxima. Las dos proteasas se inactivaron a pH 12.2. Estos resultados coinciden con los reportados para la proteasa de *P*

*fluorescens* No. 33 (pH 4.5-10 a 2°C por 24 h) (Kumura y col., 1993), para la proteasa producida por *Pseudomonas* PL-4 aislada de intestino de pescado (Hocino y col., 1997) y para proteasas producidas por diferentes cepas de *P. fluorescens* aisladas de ambientes fríos (Margesin y Schinner, 1992) (pH 6.0-9.0 a 20°C por 1 h). Richardson (1981) no determinó la estabilidad al pH de la proteasa de *P. fluorescens* B52.

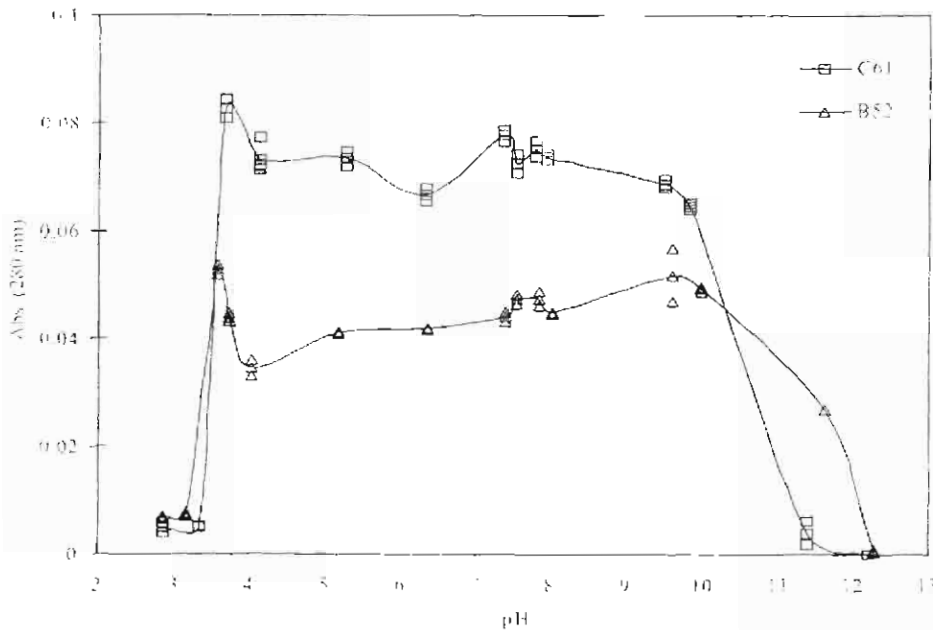


Figura 29. Estabilidad de pH de la proteasa de *Pseudomonas* sp. C61 (□) y *P. fluorescens* B52 (△) a diferentes valores.

### 5.3.2. Temperatura óptima y termoestabilidad.

La actividad óptima de la proteasa de C61 fue de 40°C (Figura 30) cuando se trató por 30 min a temperaturas entre 5°C y 90°C en presencia de caseína como sustrato. Se obtuvo el 88% de la actividad a 37°C y por arriba de 40°C la actividad de la enzima decreció



marcadamente hasta 50°C, siendo de solo el 3% de la actividad máxima. Con respecto a la proteasa de B52 se obtuvo una actividad óptima entre 40 y 50°C bajo las mismas condiciones de ensayo (Figura 30). Se presentó un decremento de actividad por arriba de 50°C disminuyendo hasta un 4% a 60°C; a 37°C se obtuvo el 83% de la actividad obtenida a la temperatura óptima. Estos resultados coinciden con lo reportado por Richardson (1981) para la misma proteasa de *P. fluorescens* B52 (45-50°C). Muchos investigadores coinciden en que las proteasas de pseudomonas tienen actividad óptima entre 35-50°C (Tabla 1), con excepción de la proteasa producida por *P. aeruginosa* CRC 15541 (60°C) (Lu y Chang, 1996) y *P. maltophilia* CS20-1A (55°C) (Kobayashi y col., 1985). La pérdida rápida de actividad a temperaturas > 40°C para la proteasa de C61 y > 50°C para la proteasa de B52, se puede deber a una inactivación por desnaturalización debido al largo periodo de incubación (30 min).

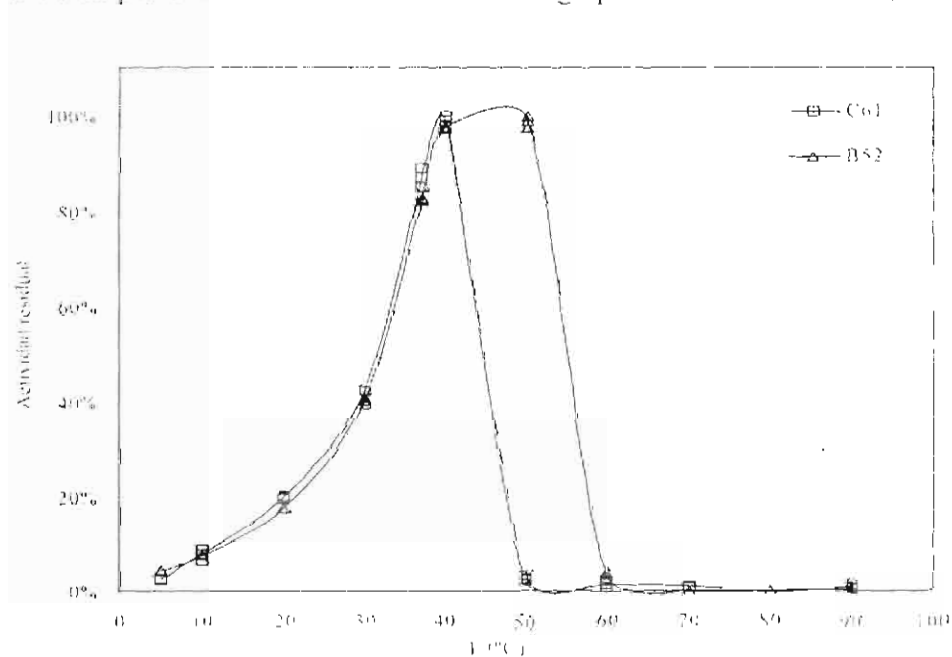


Figura 30. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de *Pseudomonas* sp. C61 (□) y *P. fluorescens* B52 (△).

Al comparar el efecto de la temperatura sobre la termoestabilidad de las dos proteasas entre 5°C y 100°C por 30 min de incubación y posterior determinación de la actividad a 37°C por 30 min en presencia de caseína como sustrato, se observó que su comportamiento fue semejante (Figura 31). La proteasa de C61 presentó una estabilidad máxima entre 5°C y 30°C, disminuyó drásticamente hasta el 8% a 40°C con respecto a la actividad máxima y se mantuvo con baja actividad hasta 60°C (5% de la actividad máxima) presentando una recuperación entre 60°C y 100°C con un máximo a 80°C de 28% con respecto a la actividad máxima. A diferencia de la proteasa de C61, la proteasa de B52 presentó un mayor intervalo de estabilidad manteniendo una máxima actividad entre 5°C y 40°C seguido de un decremento brusco hasta 3% entre 40-50°C con respecto al máximo; se observó un posterior incremento a 60°C (14% de la actividad máxima) llegando a un máximo de actividad a 80°C (42% de la actividad máxima) y disminuyendo a 100°C. Ambas proteasas presentaron todavía actividad baja pero importante a 100°C considerando que el tiempo de incubación fue prolongado (30 min), siendo del 4% para C61 y del 8% para B52 de sus respectivas actividades máximas.

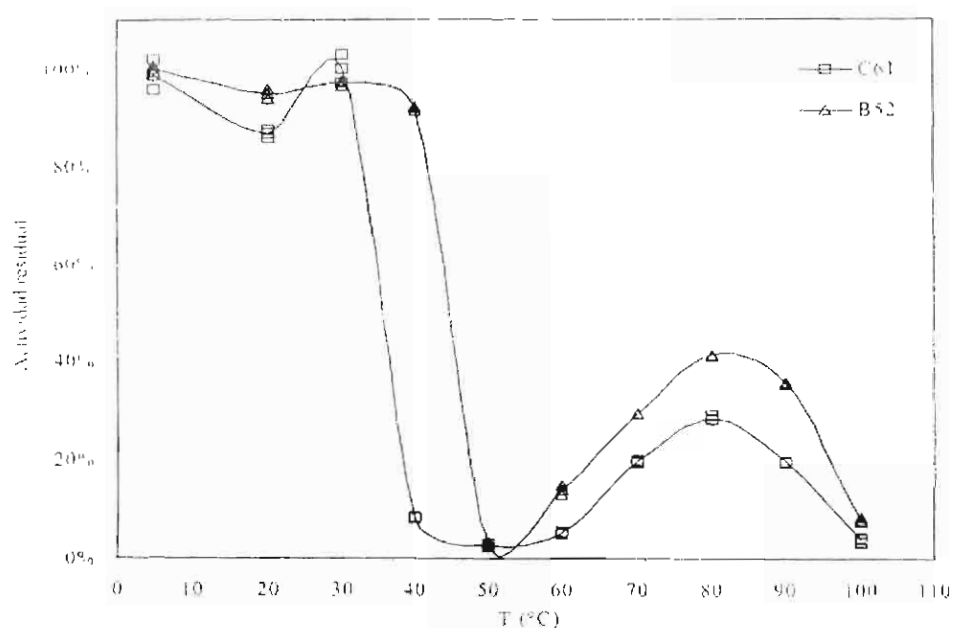


Figura 31. Estabilidad a diferentes valores de temperatura de la proteasa de *Pseudomonas* sp. C61 (□) y *P. fluorescens* B52 (Δ).

Este comportamiento ha sido descrito ampliamente para el mecanismo de inactivación de la proteasa de *P. fluorescens* 22F por Schokker y van Boekel (1998 y 1999), quienes explican que la inactivación se da en dos etapas: una primera etapa de inactivación por desdoblamiento de la proteasa a baja temperatura, entre 40-70°C; en esta etapa la molécula de la enzima nativa puede ser transformada en una forma desnaturalizada inactiva. Esta reacción de desdoblamiento reversible puede ser seguida por una reacción irreversible. Una de las posibles explicaciones es la ocurrencia de autoproteólisis intermolecular, que consiste en la hidrólisis de moléculas de proteasa llevada a cabo por moléculas nativas aun no desdoblada. Otro mecanismo posible de inactivación incluye la autoproteólisis intramolecular, donde una parte de las moléculas desdobladas se autoinactivan y se agregan (Stepaniak y Fox, 1983).

### 5.3.3. Efecto de iones metálicos e inhibidores.

El efecto de iones metálicos e inhibidores sobre la actividad de las proteasas se determinó al incubar cada proteasa en presencia de diferentes concentraciones de iones metálicos e inhibidores por 30 min a 20°C, y posterior determinación de la actividad residual sobre caseína 0.5% a las diferentes concentraciones de iones metálicos e inhibidores. La actividad de las proteasas sin iones e inhibidores fue considerada como 100%.

Con respecto al efecto de los iones metálicos (Tabla 11) sobre la actividad de la proteasa de C61, los iones que mostraron el menor efecto inhibitorio fueron  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a 1 mM (6 y 10% respectivamente) y del 23 y 14% respectivamente a 10 mM. Los iones que tuvieron mayor inhibición sobre la actividad fueron  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  a 1 mM (38, 64, 72, 76 y 87% respectivamente) incrementándose la inhibición a concentraciones de 5 y 10 mM y 2 y 3 mM para  $\text{Cu}^{2+}$ . El ion  $\text{Hg}^{2+}$  inhibió completamente a 5 y 10 mM. Con respecto a la actividad de la proteasa de B52, los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  tuvieron el menor efecto inhibitorio sobre la actividad (7, 6 y 5%) a 1 mM. Esta inhibición aumentó a concentraciones de 5 y 10 mM. Los iones  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  presentaron una mayor inhibición (34, 53, 59 y 62% respectivamente), siendo el  $\text{Hg}^{2+}$  el que inhibió por completo a concentraciones de 5 y 10 mM. La fuerte inhibición de proteasas de pseudomonas por los iones  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y principalmente  $\text{Hg}^{2+}$  ha sido reportada para: *P. fluorescens* AFT 36 aislada de leche

refrigerada en granja (Stepaniak y col., 1982), *P. fluorescens* T6, T10, T16, T18, T20 y T25 aisladas de leche bronca (Patel y col., 1983a), *P. fluorescens* No. 33 aislada de leche pasteurizada (Kumura y col., 1993), *Pseudomonas* sp. AFT-36 aislada de leche bronca (Matta y col., 1994) y *P. fluorescens* INIA 745 aislada de leche de oveja (Fernández y col., 1999).

Tabla 11. Efecto de iones metálicos sobre la actividad proteolítica.

Sal	Concentración (mM)	<i>Pseudomonas</i> sp. C61	<i>P. fluorescens</i> B52
		Actividad residual (%)	
Sin ión	—	100	100
CaCl <sub>2</sub>	1	94	93
	5	84	73
	10	77	73
MgCl <sub>2</sub>	1	90	94
	5	92	82
	10	86	80
FeCl <sub>3</sub>	1	62	95
	5	59	83
	10	19	57
ZnCl <sub>2</sub>	1	36	41
	5	9	23
	10	10	21
HgCl <sub>2</sub>	1	13	38
	5	0	0
	10	0	0
NiCl <sub>2</sub>	1	28	66
	5	10	34
	10	4	26
CuSO <sub>4</sub>	1	24	47
	2	17	42
	3	16	16

Con respecto al efecto de inhibidores sobre la actividad de las proteasas (Tabla 12), los agentes quelantes EDTA y *o*-fenantrolina (*o*-FA), presentaron una mayor inhibición sobre la

proteasa de C 61 (99 y 95% respectivamente a 1 mM). El agente reductor con grupos disulfuro,  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -MCE), presentó una inhibición de la actividad de un máximo de 13%, mientras que SDS y urea inhiben en mayor porcentaje, probablemente por la susceptibilidad de la enzima a la desnaturalización en presencia de estos agentes.

La actividad enzimática de la proteasa de B52 fue afectada, en mayor medida, por *o*-fenantrolina 1 mM en 93% y se presentó inhibición completamente a 5 y 10 mM. A diferencia de la actividad de la proteasa C61, el EDTA tuvo un menor efecto sobre la actividad, siendo de 44 y 56% a concentraciones de 1 y 5 mM respectivamente y disminuyendo hasta en un 91% a 10 mM, debido posiblemente a la acción quelante de estos dos compuestos sobre los iones metálicos. Richardson (1981) ha reportado que *P. fluorescens* B52 produce una metaloproteasa que contiene 1 átomo de  $Zn^{2+}$  y 8 átomos de  $Ca^{2+}$  por molécula, el  $Zn^{2+}$  juega un papel catalítico esencial en la proteasa B52 y es inactivada por *o*-FA. Se sabe que este quelante se une fuertemente a ciertos iones tales como  $Zn^{2+}$ , mientras que el  $Ca^{2+}$  se une débilmente. Este hecho explica que la proteasa de B52 se haya inhibido en mayor medida por *o*-FA que con EDTA. Por otro lado Liao y McCallus (1998) han demostrado, mediante análisis de secuenciación, que el gen que codifica para la síntesis de una metaloproteasa de *P. fluorescens* CY091 presenta dos dominios específicos conservados para la unión  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Previamente, se ha demostrado que el  $Ca^{2+}$  es necesario para mantener la estabilidad e integridad del sitio activo (McKellar y Cholette, 1986) pero aún no es claro si el  $Ca^{2+}$  está directamente relacionado con la producción o es solamente requerido para estabilizar la enzima después de la síntesis. Es muy probable que la proteasa de C 61 requiera en igual

medida tanto  $\text{Ca}^{2+}$  como  $\text{Zn}^{2+}$  para activar y/o estabilizar la enzima, lo que se refleja en su alto grado de inhibición tanto por EDTA como por *o*-FA.

Tabla 12. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.

Inhibidor	Concentración	<i>Pseudomonas</i> sp. C61	<i>P. fluorescens</i> B52
		Actividad residual (%)	
Sin inhibidor		100	100
EDTA	1 mM	1	56
	5 mM	7	44
	10 mM	6	9
<i>o</i> -fenantrolina	1 mM	5	6.7
	5 mM	5.5	0
	10 mM	0	0
$\beta$ -MCI-	1 mM	97	111
	5 mM	87	112
	10 mM	90	117
SDS	0.025%	36	76
	0.05%	23	65
	0.1%	5	73
	0.25%	4	3
Urea	1 M	45	230
	2 M	3	81
	3 M	0	0
	4 M	0	11



#### 5.3.4. Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

Se utilizó caseína como sustrato en un intervalo de concentración de 0.1 a 1 mg/mL (0.01 a 0.1%), en la determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para las dos proteasas. Se obtuvieron las velocidades de reacción ( $v$ ) a las diferentes concentraciones de sustrato al graficar  $\mu\text{g}$  de Tirosina equivalentes/mL vs. Tiempo (min), posteriormente los valores de las pendientes de las regiones lineales de cada concentración de sustrato se graficaron para obtener el gráfico de la ecuación de Michaelis-Menten, y calcular con mayor exactitud  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$ . Los valores de las pendientes fueron graficados para obtener la ecuación de Lineweaver-Burk. El  $K_m$  de la proteasa de C61 fue de 0.20 mg/mL (Figura 32a), lo cual indicó la afinidad de la proteasa por el sustrato (caseína), así como la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima. En el caso de la proteasa de B52 se obtuvo un valor de  $K_m$  de 0.3509 mg/mL (Figura 32b). Las dos proteasas mostraron una afinidad por la caseína como sustrato. Por otro lado, la linealización de las velocidades por la ecuación de Lineweaver-Burk mostraron una inhibición por sustrato a concentraciones por arriba de 0.6 mg/mL (0.06% de caseína) para ambas proteasas. La inhibición por sustrato puede deberse a que a altas concentraciones se promovió la agregación del sustrato, provocando un decremento de su disponibilidad (Alchanidis y Andrews, 1977; Margesin y Schinner, 1992). Por otro lado, la inhibición pudo deberse a la remoción de la posición de interacción entre enzima y sustrato en el sitio activo (Margesin y Schinner, 1992).

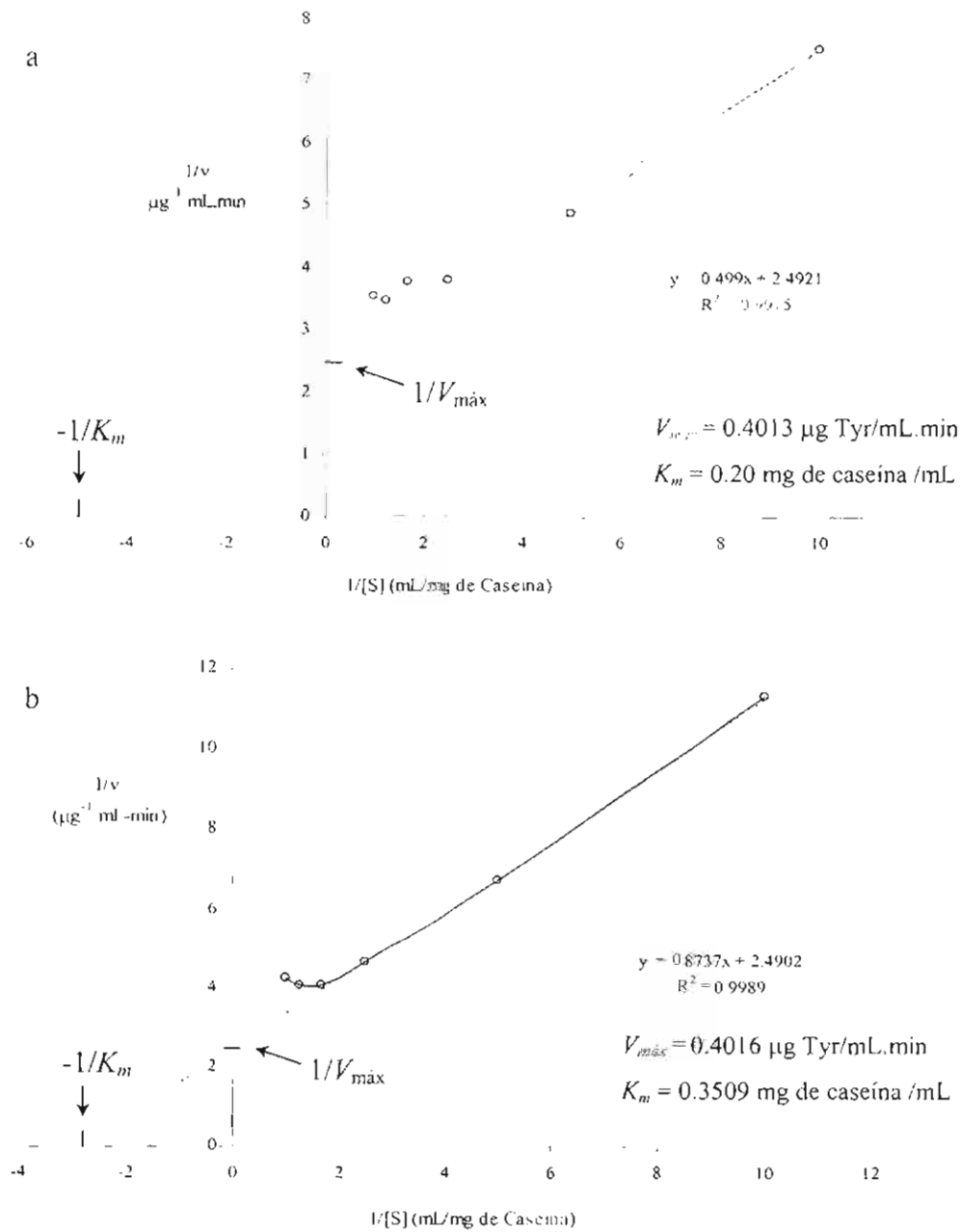


Figura 32. Gráfico de Lineweaver-Burk de la reacción de velocidad contra la concentración de caseína como sustrato de: (a) proteasa de *Pseudomonas* sp. C61; (b) proteasa de *P. fluorescens* B52.

#### 5.4. Tratamientos de curado.

Se aplicaron tres tratamientos: crecimiento a altas temperaturas, crecimiento en presencia de naranja de acridina (NAC) y SDS. El crecimiento a altas temperaturas se llevó hasta la décima generación a 42°C, posteriormente se obtuvieron colonias aisladas, las cuales se sometieron a pruebas de hidrólisis en placas de leche, observando que el 100% de las inoculadas en este medio presentaron halo de hidrólisis para las dos cepas de *Pseudomonas*. En cuanto al curado con naranja de acridina, un compuesto mutagénico, después del crecimiento de las dos cepas de *Pseudomonas* durante 24 h, fueron diluidas y plaqueadas en medio LB, obteniendo colonias aisladas, que se sometieron a prueba de hidrólisis, observando que el 100% presentaron un halo definido después de 48 h de incubación a 25°C. El mismo resultado se obtuvo con el tratamiento con SDS. Se obtuvo una variabilidad en el tamaño de los halos de hidrólisis debido probablemente a la cantidad de células inoculadas en las placas de leche y no así a la disminución de la capacidad de producción de proteasas.

En vista de estos resultados se optó por comprobar si los tratamientos de curado eliminaron a los plásmidos de las cepas de *Pseudomonas* mediante uso de antibióticos. Se emplearon 5 antibióticos, a todos los cuales las *Pseudomonas* son resistentes por portar plásmidos que confieren esta propiedad (Chacrabarty, 1976; Liao y McCallus, 1997). Los resultados se muestran en la Tabla 13 y Figura 33. Se obtuvo una inhibición del 100% en el crecimiento de las colonias obtenidas por el tratamiento a altas temperaturas en los diferentes antibióticos con respecto al testigo (cepa sin curar), lo que indicó que fueron curadas por el

tratamiento, no así para cloramfenicol donde solo disminuyó su crecimiento. Para los otros dos tratamientos no se presentaron efectos de curado sobre las dos cepas de *Pseudomonas*. Para comprobar el curado por el tratamiento a altas temperaturas fue necesario corroborar la presencia o ausencia de estos plásmidos en las cepas tratadas.

Tabla 13. Resultados de la aplicación de antibióticos.

Antibiótico	C61	NAc	SDS	T ↑	B52	NAc	SDS	T ↑
Blanco	B	B	B	B	B	B	B	B
Tc	MP	E	MP	N	MP	MP	MP	N
Cm	B	B	B	62% P 25% MP 13% E	B	B	B	62% P 13% MP 25% E
Ap	B	B	B	N	B	B	B	N
Km	P	P	87% P 13% N	N	MP	P	MP	N
Rm	B	87% P 13% N	B	N	B	B	75% B 25% P	N

Abreviaturas. Tc: tetraciclina (25 µg/mL); Cm: cloramfenicol (30 µg/mL); Ap: ampicilina (100 µg/mL); Km: kanamicina (50 µg/mL); Rm: rifampicina (100 µg/mL)

Valores de crecimiento con respecto al blanco: B: bueno; P: poco; MP: muy poco; E: escaso; N: nulo.

NAc: Naranja de acridina.

T ↑: Alta temperatura.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

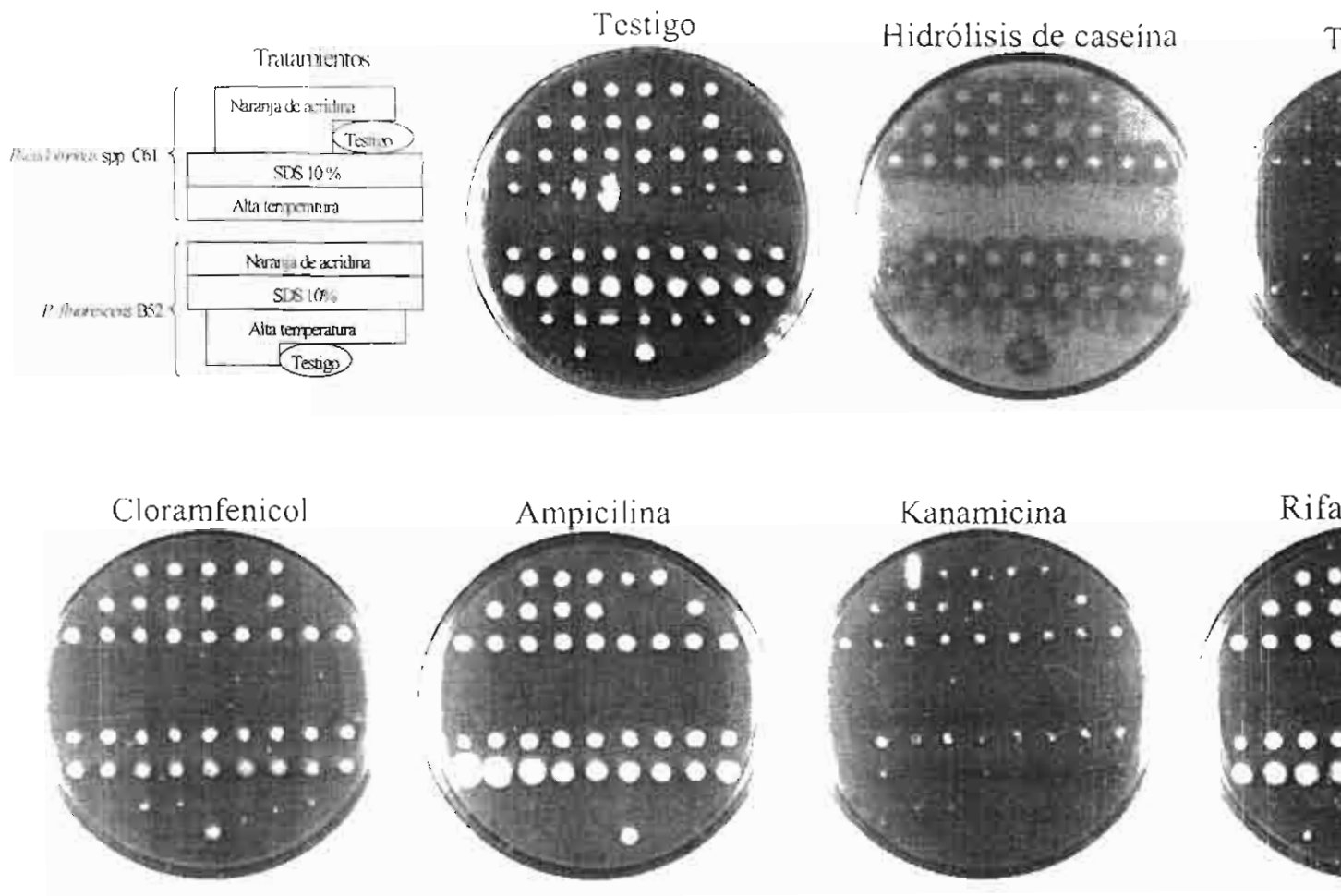


Figura 33. Crecimiento de cepas curadas y nativas en placas de TSA con diferentes antibióticos y caseína al 2%.

## 5.5. Extracción y purificación de plásmidos.

Todas las técnicas de extracción y purificación de plásmidos requieren de una lisis celular suave, en la cual el ADN plasmídico se mantiene intacto y puede ser físicamente separado del ADN cromosómico masivo. Llevar a cabo esta separación resulta más fácil con plásmidos pequeños, el grado de dificultad incrementa a medida que el tamaño del plásmido aumenta, particularmente con algunos megaplásmidos. Esta complicación es debida al hecho de que plásmidos muy grandes están generalmente presentes en un bajo número de copias.

Se utilizó inicialmente un Sistema Midipreps (Wizard Plus Midipreps, DNA Purification System, Promega), partiendo de un cultivo de 100 mL de TSB, obteniendo un precipitado celular por centrifugación que posteriormente se sometió a una resuspensión, una lisis celular, neutralización y posterior purificación mediante una resina de intercambio iónico. Las muestras obtenidas se corrieron en un gel de agarosa 0.8% a voltaje constante de 25 volts. Se utilizó como marcador de peso molecular una preparación del plásmido  $\lambda$  cortado con *Hind* III (carril *a* Figura 34).

La Figura 34 muestra los patrones electroforéticos de la extracción de plásmidos de *Pseudomonas* sp. C61 (carril *b*) y *P. fluorescens* B52 (carril *c*). Se observan barridos en los dos carriles, debido probablemente a la degradación de los plásmidos, ya sea por una degradación durante la lisis o por un rompimiento por la permanencia del plásmido en la columna, debido a

que son plásmidos mayores de 20 kbp. Por otro lado, el bajo número de copias presentes con respecto a sustancias contaminantes durante la lisis, disminuye la probabilidad de que el ADN se asocie a la resina (Boletín Técnico No. A7640. Promega. Madison, E. U., 1998).

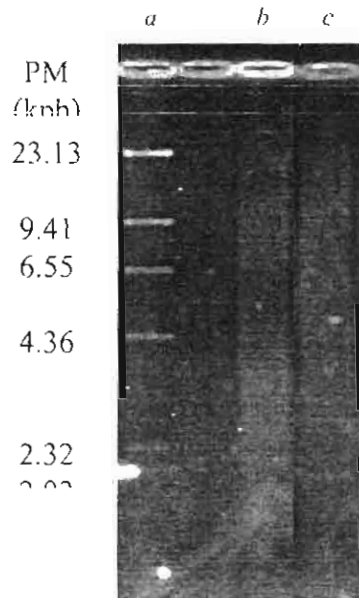


Figura 34. Resolución de extracción de plásmidos en gel de agarosa 0.8% a 25 volts constante. (a)  $\lambda$  / Hind III; (b) *Pseudomonas* sp. C61. (c) *P. fluorescens* B52.

Otro de los métodos de extracción de plásmidos utilizado, con mejores resultados, fue el descrito por Kado y Liu (1981), este método es aplicado para detectar y aislar tanto plásmidos grandes como pequeños. Se sometieron, tanto a extracción de ADN cromosómico como plasmídico, las dos cepas originales *Pseudomonas* C61 y *P. fluorescens* B52, así como 2 cepas de cada una, curadas a alta temperatura. Se analizaron en un gel de agarosa 0.8% a voltaje constante de 80 volts. En la Figura 35, se muestran los patrones de las diferentes extracciones. El ADN total de *Pseudomonas* C61 (carril b) se observó una sola banda densa mientras que su extracción de plasmido mostró dos bandas (carril c), probablemente una de

estas bandas corresponde al plásmido y la otra a ADN cromosómico, el cual no fue eliminado durante el tratamiento térmico de la lisis alcalina, ya que sólo se calentó durante 15 minutos y se ha reportado que algunas preparaciones requieren hasta 72 minutos a 65 °C para eliminar el ADN cromosómico contaminante (Kado y Liu 1981). Las preparaciones de las dos cepas mutantes de *Pseudomonas* C61 (M1 y M2) mostraron una sola banda de ADN cada una (carril *d* y *f*) mientras que sus correspondientes preparaciones de plásmidos no mostraron bandas visibles (carril *e* y *g*).

En cuanto a las preparaciones de *P. fluorescens* B52, la preparación de ADN total mostró una sola banda (carril *i*) mientras que la preparación de plásmido mostró también una sola banda de menor tamaño (carril *j*). Las extracciones de ADN total para las dos cepas mutantes (M1 y M2) revelaron una sola banda de ADN (carril *k* y *m*) y en sus correspondientes preparaciones de plásmidos no fue visible ninguna banda (carriles *l* y *n*).

Por lo anterior se concluye que las cepas tratadas fueron curadas, sin embargo no se puede concluir que los plásmidos contengan los genes necesarios para la síntesis de las proteasas, ya que aun cuando el crecimiento de las cepas curadas en las placas de caseína fue muy bajo, estas presentaron un halo poco visible.



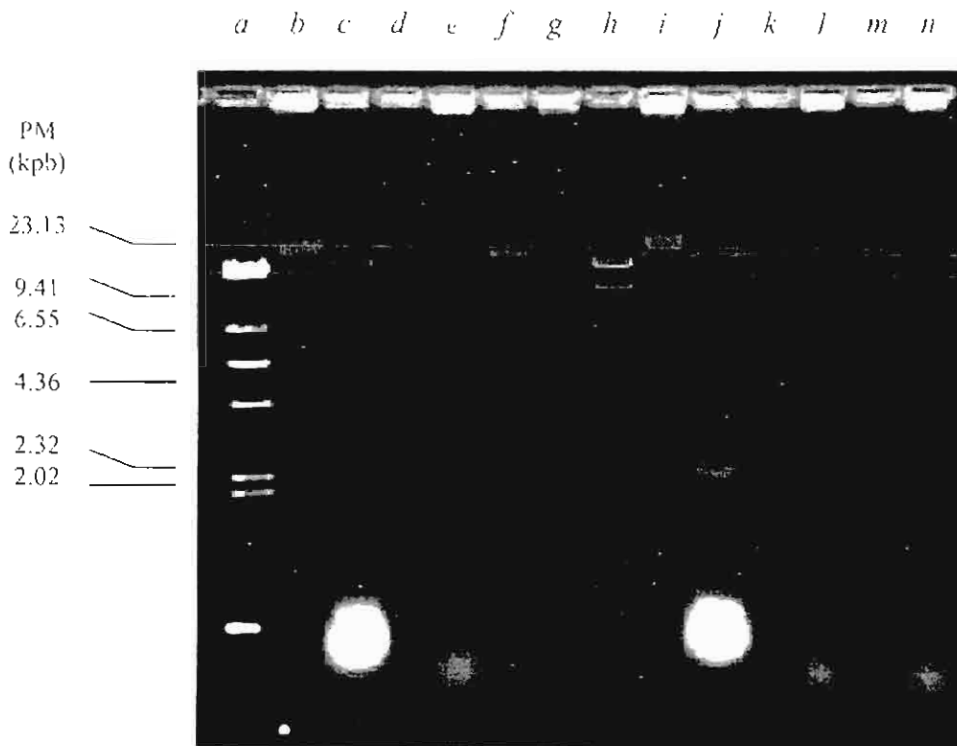


Figura 35. Resolución de ADN cromosómico (Cro) y plasmídico (Pla) de *Pseudomonas*. (a)  $\lambda$  / Hind III; (b) *Pseudomonas* C61-Cro; (c) *Pseudomonas* C61-Pla; (d) M1 *Pseudomonas* C61-Cro; (e) M1 *Pseudomonas* C61-Pla; (f) M2 *Pseudomonas* C61-Cro; (g) M2 *Pseudomonas* C61-Pla; (h)  $\lambda$  / Xho I; (i) *P. fluorescens* B52-Cro; (j) *P. fluorescens* B52-Pla; (k) M1 *P. fluorescens* B52-Cro; (l) M1 *P. fluorescens* B52-Pla; (m) M2 *P. fluorescens* B52-Cro; (n) M2 *P. fluorescens* B52-Pla.

## 5.6. Determinación del porcentaje de homología del gen ARNr 16S de las dos cepas de *Pseudomonas* con cepas tipo.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del fragmento ARNr 16S por RCP amplificaron un fragmento de aproximadamente 990 pb para las dos cepas, lo cual indica su selectividad para *pseudomonas* como lo indica Widmer y col. (1998). La búsqueda de similitud en el banco de secuencias de la EMBL reveló que la secuencia *Pseudomonas* sp. C61 tuvo un 100% de similitud con la secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S de *Pseudomonas fluorescens* bv. C (número de acceso AF228367) fue idéntico en 924 bases (1-924:313-1235) y del 99.9% con la secuencia total del gen ARN ribosomal 16S de *Pseudomonas gessardii* (número de acceso AF074384) idénticos en 923 bases (1-924:337-1262). En el caso de *P. fluorescens* B52, el porcentaje de homología con la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *Pseudomonas fluorescens* bv. C fue del 92.6%, similares en un total de 908 bases (1-980:248-1246) y del 92.5% de similitud con la secuencia total del gen ARNr 16S de *Pseudomonas gessardii* (1-980:272-1261). La alineación múltiple de las secuencias de la subunidad ARNr 16S se muestran en la Figura 36.

Estos resultados ubican a la *Pseudomonas* C61 dentro del género de *Pseudomonas*, teniendo un alto porcentaje de similitud con *Pseudomonas fluorescens* bv. C. Para poder identificar a la cepa C61 hasta nivel de especie, es necesario complementar este trabajo con la amplificación y secuenciación completa del gen ARNr 16S (~ 1500 nucleótidos), también se

podría aplicar un análisis de polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: RFLP).

Figura 36. Alineación múltiple de nucleótidos de las secuencias de ARNr 16S de *Pseudomonas* sp. C61 (C61-Ps), *Pseudomonas fluorescens* bv. C (Ps flu bv. C), *Pseudomonas gessardii* (Ps gess) and *Pseudomonas fluorescens* B52 (B52-Ps).

C61-Ps							
Ps flu bv. C			GCGGCA	GGCCTAACAC	ATGCAAGTCG		26
Ps gess	GATCCTGGCT	CAGATIGAAC	GCTGGCGGCA	GGCCTAACAC	ATGCAAGTCG		50
B52-Ps							
C61-Ps							
Ps flu bv. C	AGCGGTAGAG	AGAAGCTTGC	TTCTCTTGAG	AGCGGCGGAC	GGTGAGTAA		76
Ps gess	AGCGGTAGAG	AGAAGCTTGC	TTCTCTTGAG	AGCGGCGGAC	GGTGAGTAA		100
B52-Ps							
C61-Ps							
Ps flu bv. C	TGCCTAGGAA	TCTGCCTGGT	AGTGGGGGAT	AACGTTCCGA	AACGGACGCT		126
Ps gess	TGCCTAGGAA	TCTGCCTGGT	AGTGGGGGAT	AACGTTCCGA	AACGGACGCT		150
B52-Ps							
C61-Ps							
Ps flu bv. C	AATACCGCAT	ACGTCCTACG	GGAGAAAGCA	GGGGACCTTC	GGGCCTTGCG		176
Ps gess	AATACCGCAT	ACGTCCTACG	GGAGAAAGCA	GGGGACCTTC	GGGCCTTGCG		200
B52-Ps							
C61-Ps							
Ps flu bv. C	CTATCAGATG	AGCCTAGGTC	GGATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAATGGCTCA		226
Ps gess	CTATCAGATG	AGCCTAGGTC	GGATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAATGGCTCA		250
B52-Ps							
C61-Ps							
Ps flu bv. C	CCAAGGCGAC	GATCCGTAAC	TGGTCTGAGA	GGATGATCAG	TCACACTGGA		276
Ps gess	CCAAGGCGAC	GATCCGTAAC	TGGTCTGAGA	GGATGATCAG	TCACACTGGA		300
B52-Ps			GGTCTGAGA	GGATGATCAG	TGGT-CTG--		26
					**** **		

C61-Ps				GTG	GGGAATATTG	13
Ps flu by. C	ACTGAGACAC	GGTCCAGACT	CCTAC-GGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG	325
Ps gess	ACTGAGACAC	GGTCCAGACT	CCTAC-GGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG	350
B52-Ps	A--GA-NGAT	GATCAGTGGT	CTGAGGAGGA	TG-ATCAGTG	G----T-CTG	68
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	

C61-Ps	GACAATGGGC	GAAAGCCTGA	TCCAGCCATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGTC	63
Ps flu by. C	GACAATGGGC	GAAAGCCTGA	TCCAGCCATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGTC	375
Ps gess	GACAATGGGC	GAAAGCCTGA	TCCAGCCATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGTC	400
B52-Ps	GACGATGATC	CATCATTSGT	CTGAG-CAGG	ATG-ATGTGA	GGA-TCTGTC	116
	.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	TTCGGATTG-	TAA-AG--CA	CTTTAACTTG	GGAGGAAGGG	TTGTAGATTA	109
Ps flu by. C	TTCGGATTG-	TAA-AG--CA	CTTTAACTTG	GGAGGAAGGG	TTGTAGATTA	421
Ps gess	TTCGGATTG-	TAA-AG--CA	CTTTAACTTG	GGAGGAAGGG	TTGTAGATTA	446
B52-Ps	TACGGATAGC	TAATAGGCTA	CTTTAACTTG	GGAGGAAGGG	CATTAACCTA	166
	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	ATACTCTGCA	ATTTTGACGT	TACCGACAGA	ATAAGCACCG	GCTAACTCTG	159
Ps flu by. C	ATACTCTGCA	ATTTTGACGT	TACCGACAGA	ATAAGCACCG	GCTAACTCTG	471
Ps gess	ATACTCTGCA	ATTTTGACGT	TACCGACAGA	ATAAGCACCG	GCTAACTCTG	496
B52-Ps	ATACGTTAGT	GTTTTGACGT	TACCGACAGA	ATAAGCACCG	GCTAACTCTG	216
	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CAGAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	209
Ps flu by. C	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CAGAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	521
Ps gess	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CAGAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	546
B52-Ps	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CAGAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	266
	.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	GGGCGTAAAG	CGCGCGTAGG	TGGTTAGTTA	AGTTGGATGT	GAAATCCCCG	259
Ps flu by. C	GGGCGTAAAG	CGCGCGTAGG	TGGTTAGTTA	AGTTGGATGT	GAAATCCCCG	571
Ps gess	GGGCGTAAAG	CGCGCGTAGG	TGGTTAGTTA	AGTTGGATGT	GAAATCCCCG	596
B52-Ps	GGGCGTAAAG	CGCGCGTAGG	TGGTTAGTTA	AGTTGGATGT	GAAATCCCCG	316
	.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTCAAAACTG	ACTGACTAGA	GTATGGTAGA	309
Ps flu by. C	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTCAAAACTG	ACTGACTAGA	GTATGGTAGA	621
Ps gess	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTCAAAACTG	ACTGACTAGA	GTATGGTAGA	646
B52-Ps	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTCAAAACTG	ACTGACTAGA	GTATGGTAGA	366
	.....*	*.....*	*.....*	*.....*	*.....*	

C61-Ps	GGGTGGTGGG	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATAGGAAGGA	659
Ps flu bv. C	GGGTGGTGGG	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATAGGAAGGA	671
Ps gess	GGGTGGTGGG	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATAGGAAGGA	696
B52-Ps	GGGTGGTGGG	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATAGGAAGGA	416
-----						
C61-Ps	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	CACCTGGACT	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	409
Ps flu bv. C	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	CACCTGGACT	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	721
Ps gess	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	CACCTGGACT	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	746
B52-Ps	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	CACCTGGACT	AATACTGACA	CTGAGGTGCG	466
-----						
C61-Ps	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	459
Ps flu bv. C	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	771
Ps gess	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	796
B52-Ps	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	516
-----						
C61-Ps	ACGATGTCAA	CTAGCCGTTG	GGAGCCTTGA	GCTCTTAGTG	GCGCAGCTAA	509
Ps flu bv. C	ACGATGTCAA	CTAGCCGTTG	GGAGCCTTGA	GCTCTTAGTG	GCGCAGCTAA	821
Ps gess	ACGATGTCAA	CTAGCCGTTG	GGAGCCTTGA	GCTCTTAGTG	GCGCAGCTAA	846
B52-Ps	ACGATGTCAA	CTAGCCGTTG	GAAGCCTTGA	GCTTTTAGTG	GCGCAGCTAA	566
-----						
C61-Ps	CGCATTAAGT	TGACCGCCTG	GGGAGTACGG	CCGCAAGGTT	AAAACTCAAA	559
Ps flu bv. C	CGCATTAAGT	TGACCGCCTG	GGGAGTACGG	CCGCAAGGTT	AAAACTCAAA	871
Ps gess	CGCATTAAGT	TGACCGCCTG	GGGAGTACGG	CCGCAAGGTT	AAAACTCAAA	896
B52-Ps	CGCATTAAGT	TGACCGCCTG	GGGAGTACGG	CCGCAAGGTT	AAAACTCAAA	616
-----						
C61-Ps	TGAATTGACG	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTGAA	609
Ps flu bv. C	TGAATTGACG	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTGAA	921
Ps gess	TGAATTGACG	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTGAA	946
B52-Ps	TGAATTGACG	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTGAA	666
-----						
C61-Ps	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGCCTTGAC	ATCCAATGAA	CTTTCTAGAG	659
Ps flu bv. C	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGCCTTGAC	ATCCAATGAA	CTTTCTAGAG	971
Ps gess	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGCCTTGAC	ATCCAATGAA	CTTTCTAGAG	996
B52-Ps	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGCCTTGAC	ATCCAATGAA	CTTTCTAGAG	716
-----						

C61-Ps	ATAGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACATTGAGAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	709
Ps flu bv. C	ATAGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACATTGAGAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	1021
Ps gess	ATAGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACATTGAGAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	1046
B52-Ps	ATAGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACATTGAGAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	766
-----						
C61-Ps	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCGTAACGA	GCGCAACCCT	759
Ps flu bv. C	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCGTAACGA	GCGCAACCCT	1071
Ps gess	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCGTAACGA	GCGCAACCCT	1096
B52-Ps	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCGTAACGA	GCGCAACCCT	816
-----						
C61-Ps	TGTCCTTAGT	TACCAGCACG	TAATGGTGGG	CACTCTAAGG	AGACTGCCGG	809
Ps flu bv. C	TGTCCTTAGT	TACCAGCACG	TAATGGTGGG	CACTCTAAGG	AGACTGCCGG	1121
Ps gess	TGTCCTTAGT	TACCAGCACG	TAATGGTGGG	CACTCTAAGG	AGACTGCCGG	1146
B52-Ps	TGTCCTTAGT	TACCAGCACG	TAATGGTGGG	CACTCTAAGG	AGACTGCCGG	866
-----						
C61-Ps	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	859
Ps flu bv. C	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	1171
Ps gess	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	1196
B52-Ps	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	916
-----						
C61-Ps	GGCCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGTC	GGTACAGAGG	GTTGCCAAGC	909
Ps flu bv. C	GGCCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGTC	GGTACAGAGG	GTTGCCAAGC	1221
Ps gess	GGCCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGTC	GGTACAGAGG	GTTGCCAAGC	1246
B52-Ps	GGCCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGTC	GGTACAGAGG	GTTGCCAAGC	966
-----						
C61-Ps	CGCGAGGTGG	AGCTA				924
Ps flu bv. C	CGCGAGGTGG	AGCTAATCCC	ACAAAACCGA	TCGTAGTCCG	GATCGCAGTC	1271
Ps gess	CGCGAGGTGG	AGCTAATCCC	ANAAAACCGA	TCGTAGTCCG	GATCGCAGTC	1296
B52-Ps	CGCGAGGTGG	AGCTAA				982
-----						
C61-Ps						
Ps flu bv. C	TGCAACTCGA	CTGCGTGAAG	TGGGAATCGC	TAGTAATCGC	GAATCAGAAT	1321
Ps gess	TGCAACTCGA	CTGCGTGAAG	TGGGAATCGC	TAGTAATCGC	GAATCAGAAT	1346
B52-Ps						
-----						
C61-Ps						
Ps flu bv. C	GTCGCGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAAT	1371
Ps gess	GTCGCGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAAT	1396
B52-Ps						
-----						

C61-Ps						
Ps flu bv. C	GGGAGTGGGT	TGCACCAGAA	GTAGCTAGTC	TAACCTTCGG	GAGGACGGTT	1421
Ps gess	GGGAGTGGGT	TGCACCAGAA	GTAGCTAGTC	TAACCTTCGG	GAGGACGGTT	1446
B52-Ps	-----	-----	-----	-----	-----	
C61-Ps						
Ps flu bv. C	ACCACGGTG-	GGACGGTTAC	CACGGTG			1446
Ps gess	ACCACGGTGT	G-A---TT-C	-A---TGACT	GGGGTGAAGT	CGTAACAAGG	1487
B52-Ps	-----*	-*-----*	*-----*			
C61-Ps						
Ps flu bv. C						
Ps gess	TAGCCGTAGG	GGAACCTGCG	GCTGGATCAC			1517
B52-Ps						

## 6. Conclusiones.

---

1. El efecto inductor del  $\text{CaCl}_2$  y de la leche descremada en polvo se vio reflejado en un incremento en la producción de proteasa siendo mayor en TSB con  $\text{CaCl}_2$  al 5 mM. La máxima producción de proteasa para las dos cepas se dió al final de la fase logarítmica (16 h) y principios de la fase estacionaria (24 h) (idiofase).
2. La proteasa de *Pseudomonas* C61 es sensible a la ausencia de calcio por lo que es necesario que durante las etapas de purificación se mantengan en soluciones con calcio, no así la proteasa de *P. fluorescens* B52 la cual es menos sensible. Se obtuvo un peso molecular de la proteasa de *Pseudomonas* sp. C61 de 46.1 KDa y de 48 KDa para la proteasa de *P. fluorescens* B52.
3. La proteasa de C61 presento un máximo de actividad entre pH 7.5 y 8, mientras la proteasa de B52 entre pH 7 a 9. Esto las clasifica como proteasas alcalinas. En cuanto a la estabilidad al pH, las dos proteasas presentaron alta estabilidad en un amplio intervalo de pH (3.6 - 10).
4. La temperatura máxima de actividad de la proteasa C61 fue de 40°C, mientras que la proteasa de B52 presentó una actividad máxima entre 40 y 50°C. Las dos proteasas



- presentaron un comportamiento similar con respecto a la estabilidad a diferentes temperaturas, presentando una inactivación máxima a 50°C y una posterior recuperación parcial de la actividad entre 60 y 100°C, indicando su termorresistencia así como también su capacidad de sufrir un rearrreglo conformacional y una probable autoproteólisis.
5. La proteasa C61 es más sensible a la presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , SDS y urea; mientras que la proteasa de B52 a  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , SDS y urea a concentraciones mayores de 1 M. La proteasa C61 requiere la presencia de calcio para mantener su actividad mientras que la proteasa de B52 requiere tanto calcio como zinc. Las dos enzimas se clasifican como metaloproteasas.
  6. Las dos proteasas presentaron una afinidad por la caseína como sustrato, dando valores de  $K_m$  de 0.20 mg/mL para la proteasa de C61 y de 0.3509 mg/mL para B52. Presentaron inhibición por sustrato a concentraciones por arriba de 0.6 mg/mL.
  7. Las dos cepas portan plásmidos grandes que le confieren resistencia a antibióticos. El tratamiento de curado más efectivo fue a alta temperatura (42°C) para ambas cepas.
  8. La cepa C61, basándose en la determinación del porcentaje de homología del gen ARNr 16S con secuencias de cepas tipo, indica que pertenece al género *Pseudomonas*. Se recomienda realizar la amplificación y secuenciación completa del gen ARNr 16S para determinar el nivel de especie de esta cepa.

## 7. Bibliografía.

---

- Adams, D. M., Barach, J. T. y Speck, M. L. 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, **58**: 828–834.
- Akkermans, A. D. L., van Elsas J. D. y Bruijn, F. J. 1995. Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Países Bajos. pp. 1–488.
- Alford, J. A. y Elliot, L. E. 1960. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperature. I Action of *Pseudomonas fluorescens* on lard. *Food Research*, **25**: 296–303. (citado por Hernández, 1991).
- Alichanidis, E. y Andrews, A. T. 1977. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR-11. *Biochemica et Biophysica Acta*, **485**: 424–433.
- Amann, R. L., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection on individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, **59**: 143–169.
- Amrute, S. B. y Corpe, W. A. 1978. Production and extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens*. En: *Developments in Industrial Microbiology*. ELA Underkeffer. Nueva York. pp. 465–471. (citado por Hernández, 1991).

- Azcona, J. I., Martín, R., Asensio, M. A., Hernández, P. E. y Sanz, B.** 1988. Heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AH-70: purification by affinity chromatography on cyclopeptide antibiotics. *Journal of Dairy Research*, **55**: 217–226.
- Ayres, J. C.** 1960. The relationships of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**: 471–486.
- Barach, J. T. y Adams, D. M.** 1977. Thermostability at ultra high temperature of thermolysin and protease from a psychrotrophic *Pseudomonas*. *Biochemica et Biophysica Acta*, **485**: 417–423.
- Barach, J. T., Adams, D. M. y Speck, M. L.** 1976. Stabilization of psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultra high temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, **31**: 875–879.
- Beatty, S. A. y Collins, V. K.** 1939. Studies of fish spoilage. VI. Breakdown of carbohydrates, proteins and amino acids during spoilage of cod muscle press juice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **4**: 413–.
- Bodey, G. P., Bolívar, R., Fainstein, V. y Jadeja, L.** 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Review Infectious Disease*, **5**: 279–313.
- Boethling, R. S.** 1975. Purification and properties of a serinprotease from *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology*, **121**: 933–941. (citado por Hernández, 1991).
- Boletín Técnico No. 23225.** BCA Protein Assay Reagent. Pierce and Warriner, Chester, Inglaterra, 1993.
- Boletín Técnico No. A7640.** Kit Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps, DNA Purification System, Promega, Madison, E. U. 1998.

- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. y Gardan, L.** 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, **20**: 51–63.
- Boye, M., Ahl, T. y Molin, S.** 1995. Application of a strain-specific rRNA oligonucleotide probe targeting *Pseudomonas fluorescens* Ag1 in a mesocosm study of bacterial release into the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4): 1384–1390.
- Brown, A. D. y Weidemann, J. F.** 1958. The taxonomy of the psychrophilic meat-spoilage bacteria: a reassessment. *Journal of Applied Bacteriology*, **21**: 11–17.
- Bucky, A. R., Robinson, D. S. y Hayes, P. R.** 1987. Factors affecting the heat stability of lipase produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Chemistry*, **23**: 159–173. (citado por Hernández, 1991).
- Bustos, R. O. y Michael, H.** 1994. Microbial deproteinisation of waste prawn shell. Institute of Chemical Engineers Symposium Series, Institute of Chemical Engineers, Rugby, Inglaterra. pp. 13–15.
- Chakrabarty, A. M., Chou, G. y Gunsalus, I. C.** 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, E. U.*, **70**: 1137–1140.
- Chakrabarty, A. M.** 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. *Annual Review of Genetics*, **10**: 7–30.
- Christen, G. L. y Marshall, R. T.** 1984. Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *Journal of Dairy Science*, **67**: 1680–1687.

- Cousin, M. A. y Marth, E. H. 1977. Changes in milk protein caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft*, **32**: 337–341.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. y Maas, W. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiology Review*, **52**: 375–395.
- Crosa, J. H., Tolmasky, M. E., Actis, L. A. y Falkow, S. 1994. Plasmids. En: *Methods for General and Molecular Bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood y N. R. Krieg (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 365–386.
- Crosa, J., Hedges, L. y Schiewe M. 1980. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, **27**: 897–902.
- Damoglou, A. P. y Downey, G. 1983. Purification and preliminary characterization of a proteolytic enzyme produced by a marine *Pseudomonas fluorescens*. *Rec. Agric. Res.*, **31**: 23. (citado por Fox y col., 1989).
- De Vos, P., Goor, M., Gillis, M. y De Ley, J. 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **35**: 169–184.
- Doung, F., Lazdunski, A., Cami, B. y Murgier, M. 1992. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*. relationships to other secretory pathways. *Gene*, **121**: 47–54.
- Duggleby C. J., Bayley, S. A., Worsey, M. J., Williams, P. A. y Broda, P. 1977. Molecular sizes and relationship of TOL plasmids in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, **130**: 1274–1280.

- Fairbairn, D. J. y Law, B. A. 1986a. Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, **53**: 139–177. (citado por Hernández, 1991)
- Fairbairn, D. J. y Law, B. A. 1986b. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescens* NCDO 2085. *Journal of Dairy Research*, **53**: 457–466. (citado por Hernández, 1991).
- Fairbairn, D. J. y Law, B. A. 1987. The effect on nitrogen and carbon sources on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, **62**: 105–113. (citado por Hernández, 1991).
- Fernández, J., Mohedano, A. F., Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. 1999. Purification and characterization of three extracellular proteinases produced by *Pseudomonas fluorescens* INIA 745, an isolate from ewe's milk. *Journal of Food Protection*, **62**(5): 543–546.
- Fox, P. F., Power, P. y Cogan, T. M. 1989. Isolation and molecular characteristics. En: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R. C. (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 57–120.
- Fox, P. F. y Stepaniak, L. 1983. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *Journal of Dairy Research*, **50**: 77–89.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E. y Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, **214**: 65–69.

- García Collia, P., Mas, B., Ordóñez, J. A. y Sanz Pérez, B.** 1981. Incidencia de *Pseudomonas* en la leche cruda refrigerada. *VIII Congreso Nacional de Microbiología*. Madrid, España. pp. 314. (citado por Hernández, 1991).
- Gebre-Egziabher, Humbert, E. S. y Bluakenagel, G.** 1980. Heat stable proteases from psychrotrophics in milk. *Journal of Food Protection*, **43**: 197–200. (citado por Hernández, 1991).
- Gill, C. O.** 1983. Meat spoilage and evaluation of the potencial storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection*, **45**(5): 444–452.
- Gill, C. O. y Newton, K. G.** 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, **43**: 189–195.
- Gilligan, P. H.** 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**: 35–51.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tummler, B. y Romling, U.** 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**: 132–143.
- Godfrey, T. y West, S.** 1996. Industrial enzymology, 2a edición. Macmillan Publishers Inc. Nueva York, E. U. pp. 3
- Good, L. y Nazar, R. N.** 1997. Plasmid mini-preparations from culture streaks. *BioTechniques Euro Edition*, **22**: 404–406.
- Greer, G. G.** 1989. Red meats, poultry and fish. En: *Enzymes of psychrotrophos in raw food*. C. R. McKellar (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 267–292.

- Grothues, D., Koopmann, U., von der Harardt, H. y Gummler, B. 1988. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of fibrosis sibling with closely related strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**: 1973–1977.
- Guiot, H. F. L., van der Meer, J. W. M. y van Furth, R. 1981. Selective antimicrobial modulation of human microbial flora: infection prevention in patients with decreased host defense mechanisms by selective elimination of potentially pathogenic bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, **143**: 644–102.
- Guzzo, J., Murgier, A., Filloux, A. y Lazdunski, A. 1990. Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **172**: 942–948.
- Guzzo, J., Pages, J-M., Doung, F., Lazdunski, A. y Murgier, M. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion gene and study of secretion mechanism. *Journal of Bacteriology*, **173**(17): 5290–5297.
- Hagmann, M. L., Geuss, U., Fischer, S. y Kresse, G. B. 1995. Peptidyl-Asp metalloendopeptidase. En: *Methods in Enzymology*. Colowick, S. P. y O. Kaplan (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York. Vol. 248, pp. 782–787.
- Hamamoto, T., Kaneda, M., Horikoshi, K. y Kudo, T. 1994. Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 3878–3880.
- Hamilton, M. A. E. y Ahmad, M. H. 1994. Isolation and characterization of *Pseudomonas* from processed chicken in Jamaica. *Letters in Applied Microbiology*, **18**: 21–23.



- Hernández, M.** 1991. Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrófilas y su efecto en la leche y productos lácteos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, **31**(1): 1-18.
- Hirota, Y.** 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **46**: 57-64.
- Hugh, R. y Leifson, E.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, **66**: 24-26.
- Hurley, W. C., Gardner, F. A. y Van der Zant, W. C.** 1963. Some characteristics of a proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Food Science*, **28**: 47-54.
- Inouye, S.** 1998. Plasmids. En: *Pseudomonas*. T. C. Montie (ed.). Plenum Press, Nueva York. pp. 1-33.
- Jackman, D. M., Bartlett, F. M. y Patel, T. R.** 1983. Heat-stable proteases from psychrotrophic Pseudomonads: comparison of immunological properties. *Applied and Environment Microbiology*. **46**: 6-12.
- Jay, J. M.** 2000. Taxonomy, role and significance of microorganisms in foods. En: *Modern food microbiology*. 6a edición. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp. 13-34.
- Juffs, H. S.** 1973. Identification of *Pseudomonas* spp. isolated from milk produced in South East Queensland. *Journal of Applied Bacteriology*, **36**: 585-598. (citado por Suhren, 1989).

- Juffs, H. S. 1976. Effects of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Ps. aeruginosa* in broth and milk. *Journal of Applied Bacteriology*, **40**: 23–32.
- Juan, S. M. y Cazzulo, J. J. 1976. The extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens*. *Experientia*, **32**: 1120–1122.
- Kado, C. I., y Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, **145**: 1365–1373.
- Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R. J. y Thomashow, L. S. 1996. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environment Microbiology*, **62**: 552–563.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Devos, P., Gillis, M. y Schleifer K. H. 1996. Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**: 465–477.
- Kirsch, R. H., Berry, F. E., Baldwin, C. L. y Foster, E. M. 1952. The bacteriology of refrigerated ground beef. *Food Research*, **17**: 495–503.
- Kishonti, E. y Sjöström, G. 1970. Influence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality. En: *Proc. 18<sup>th</sup> Int. Dairy Congress, IE*. Ramsey Wade, Melbourne Australia. pp. 501.
- Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. y Sayito, M. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**: 693. (citado por Fox y col., 1989).

- Koga, H., Aramaki, H., Yanaguchi, E., Takeuchi, K., Horiuchi, T., y Gunsalus, I. C.** 1986. *camR*, a negative regulator locus of the cytochrome P-450cam hydroxylase operon, *Journal of Bacteriology*, **166**: 1089–1095.
- Kohlmann K. L., Nielsen, S. S. y Ladisch, M. R.** 1991. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M316. *Journal of Dairy Science*, **74**: 4125–4136.
- Kunitz, M.** 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology*, **30**: 291–310.
- Kumura, H., Mikawa, K. y Saito, Z.** 1993. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Journal of Dairy Research*, **60**: 229–237.
- Kwan, K. H. y Skura, B. J.** 1985. Identification of proteolytic pseudomonads isolated from raw milk. *Journal of Dairy Science*, **68**: 1902–1910. (citado por Suhren, 1989).
- Law, B. A., Andrews, A. T. y Sharpe, M. E.** 1977. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Research*, **44**: 145–148.
- Law, B. A. y Fairbairn, D. J.** 1982. Influence of nutritional factors on the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, **65**: 74. (citado por McKellar, 1989).
- Law, B. A. y Fairbairn, D. J.** 1985. Factors controlling proteinase production by psychrotrophic bacteria. En: *Annual Report of the National Institute. Research in Dairying*, Food Research Centre, Reading, Inglaterra, pp. 181.

- Lederberg, J. 1952. Cell genetic and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*, **32**: 403–430.
- Leinmüller, R. y Christophersen, J. 1982a. Studies on a heat-resistant proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*. *Milchwissenschaft*, **37**: 270–272.
- Leinmüller, R. y Christophersen, J. 1982b. Studies on the heat inactivation and characterization of thermoresistant proteases from *Pseudomonas fluorescens*. *Milchwissenschaft*, **37**: 472–475.
- Liao, C. H. y McCallus D. E. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of an Extracellular Protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environment Microbiology*, **64**(3): 914–921.
- Litchfield, C. D. y Prescott, J. M. 1970a. Regulation of proteolytic enzyme production of *Aeromonas proteolytica* I. Extracellular endopeptidase. *Canadian Journal of Microbiology*, **16**: 17–22.
- Litchfield, C. D. y Prescott, J. M. 1970b. Regulation of proteolytic enzyme production of *Aeromonas proteolytica* II. Extracellular aminopeptidase. *Canadian Journal of Microbiology*, **16**: 23–27.
- Liu, P. V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, **130**: 94–99.
- Lu, S. F. y Chang, P. P. 1996. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. *Letters in Applied Microbiology*. **22**: 5–9.
- Malik, R. K. y Mathur, D. K. 1984. Purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25. *Journal of Dairy Science*, **67**: 522–530.

- Margesin, R. y Schinner, F.** 1992. A comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General and Applied Microbiology*, **38**: 209–225.
- Margesin, R. y Schinner, F.** 1993. Psychrophilic and psychrotrophic proteolytic microorganisms from environmental habitats. *AgBiotech News and Information*, **5**(4): 153N–157N.
- Marshall, R. T. y Marsteller, J. K.** 1981. Unique response to heat of extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* M5. *Journal of Dairy Science*, **64**: 1545–1550.
- Matta, H., Punj, V. y Kalra, M. S.** 1994. Isolation and partial characterization of a heat stable extracellular protease from *Pseudomonas* sp. AFT-36. *Milchwissenschaft*, **49**(4): 186–189.
- Mayerhofer, H. J., Marshall, R. T., White, C. H. y Lu, M.** 1973. Characterization of heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Applied Microbiology*, **25**: 44–48.
- McKellar, R. C.** 1989. Regulation and control of synthesis. En: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. R. C. McKellar (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 153–172.
- McKellar, R. C.** 1982. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, **53**: 305–316.
- McKellar, R. C. y Cholette, H.** 1984. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen and phosphate. *Applied and Environment Microbiology*, **47**: 1224–1227.

- McKellar, R. C. y Cholette, H.** 1985a. Inhibition by chelating agents of the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* 32A. *Journal of Dairy Research*, **52**: 91-100.
- McKellar, R. C. y Cholette, H.** 1985b. Stimulation by calcium of the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* spp. *Journal of Dairy Science*, **68**: 3216-3223.
- McKellar, R. C. y Cholette, H.** 1986. Possible role of calcium in the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, **60**: 37-44.
- Mitchell, G. E., Ewings, K. N. y Bartley, J. P.** 1986. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Research*, **53**: 97-115. (citado por Hernández, 1991).
- Mitchell, S. L. y Marshall, R. T.** 1989. Properties of heat-stable proteases of *Pseudomonas fluorescens*: characterization and hydrolysis of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, **72**: 864-874.
- Molin, G. y Ternström, A.** 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonas. *Journal of General Microbiology*, **128**: 1249-1264.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C. y Kari, D. M.** 1995. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, -hydrothermal vent system. Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environment Microbiology*, **61**: 1555-1562.

- Murray, S. K., Kwan, K. K. H., Skura, B. J. y McKellar, R. C. 1983. Effect of nitrogen flushing on the production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk. *Journal of Food Science*, **48**: 1166–1169.
- Myhara, R. M. y Skura, B. J. 1989. Growth conditions affecting proteolytic enzyme and extracellular vesicle production by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *Journal of Food Science*, **54**(3): 686–690, 694.
- Nashif, S. A. y Nelson, F. E. 1953. The lipase of *Pseudomonas fragi*. II. Factors affecting lipase production. *Journal of Dairy Science*, **36**: 471–480.
- Nigam, J. N., Pillai, K. R. y Baruah, J. N. 1981. Effect of carbon and nitrogen sources on neutral proteinase production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiologica*, **26**: 358 (citado por McKellar, 1989).
- Noreau, J. y Drapeau, G. R. 1979. Isolation and properties of the protease from the wild-type and mutant strains of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology*, **140**(3): 911–916.
- O'Callaghan, E. M., Tañer, M. S. y Boulnois, G. J. 1994. Development of a PCR probe test for identifying *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia*. *Journal of Clinical Pathology*, **47**: 222–226.
- O'Connor, R. E., Ewings, K. N., Nayward, A. C. y O'Rourke, P. K. 1986. Numerical taxonomic of proteolytic psychrotrophs from Queensland raw milks. *Journal of Applied Bacteriology*, **61**: 25–38. (citado por Suhren, 1989).
- O'Reilly, T. y Day, D. F. 1983. Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environment Microbiology*, **45**: 1132–1135.

- O'Sullivan, D. J. y O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Review*, **56**(4): 662–676.
- Oh, Y. S., Shih, I. L., Tzeng, Y. M. y Wang, S. L. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 3–10.
- Old, R. W. y Primrose, S. B. 1987. Los plásmidos como vehículo de clonación para uso en *Escherichia coli*. En: *Principios de Manipulación Genética. Introducción a la Ingeniería Genética*. 3a edición. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 45–69.
- Palleroni, N. J. 1984. Family I: *Pseudomonadacea*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 141. (citado por Suhren, 1989).
- Palleroni, N. J. 1992. Human- and animal-pathogenic Pseudomonads. En: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer Verlag, Nueva York. pp. 3086–3103.
- Palleroni, N. J. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, **64**: 231–251.
- Patel, T. R. y Bartlett, F. M. 1988. Heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonas: secondary structure and heat stability. *Food Microbiology*, **5**: 201–211.
- Patel, T. R., Bartlett, F. M. y Hamid, J. 1983a. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic *Pseudomonas*. *Journal of Food Protection*, **46**(2): 90–94.



- Patel, T. R., Jackman, D. M. y Bartlett, F. M. 1983b. Heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T16: purification by affinity column chromatography and characterization. *Applied and Environment Microbiology*, **46**: 333–337.
- Peterson, A. C. y Gunderson, M. F. 1960. Some characteristics of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbiology*, **8**: 98–104. (citado por Fox y col., 1989).
- Porzio, M. A. y Pearson, A. M. 1975. Isolation and characterization of an extracellular neutral proteinase from *Pseudomonas fragi*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **348**: 235–241.
- Rainey, P. B., Peiley, M. J. y Thompson, I. P. 1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. *Microbiology*, **140**: 2315–2331.
- Rainey, P. B. y Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, **394**: 69–72.
- Rademaker, J. L. W. y de Bruijn, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. En: *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*. G. Caetano-Anollés, y P. M. Gresshoff (eds.). John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. pp. 151–171.
- Rheinwald, J. G., Chakrabarty, A. M. y Gunsalus, I. C. 1973. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **70**: 885–889.

- Richard, J.** 1981. Classification adansonniene et identification de *Pseudomonas* psychrotrophes isolés du lait cru conservé à basse température. *Annales de Microbiologie (Paris)*, **132A**: 171–182. (citado por Suhren, 1989).
- Richardson, B. C.** 1981. The purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B52. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **16**: 195–207.
- Richardson, B. C. y Whaiti, I. E.** 1978. Partial characterization of heat-stable extracellular protease of some psychrotrophic bacteria from raw milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **13**: 172–176. (citado por Hernández, 1991).
- Roa, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. y Deshpande, V. V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3): 597–635.
- Rowe, M. T. y Gilmour, A.** 1983. Nutritional factors affecting extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *Milchwissenschaft*, **38**(12): 705–707. (citado por Hernández, 1991).
- Sakata, K., Yajima, H., Tanaka, K., Sakamoto, Y., Yamamoto, K., Yoshida, A. y Dohs, Y.** 1993. Erythromycin inhibits the production of elastase by *Pseudomonas aeruginosa* without affecting its proliferation *in vitro*. *American Review of Respiratory Disease*, **148**: 1061–1065.
- Samagh, B. S. y Cunningham, J. D.** 1972. Numerical taxonomy of the genus *Pseudomonas* from milk and milk products. *Journal of Dairy Science*, **55**: 19–24 (citado por Suhren, 1989).

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** 1989. Extraction and purification of plasmid DNA. En: *Molecular cloning. a laboratory manual*. 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. pp. 1.21–1.52.
- Sayler, G. S., Hooper, S. W., Layton, A. C. y King, J. M. H.** 1990. Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. *Microbial Ecology*, **19**: 1–20.
- Schimpff, S. C.** 1980. Infection prevention during profound granulocytopenia. New approaches to alimentary canal microbial suppression. *Annals of Internal Medicine*, **93**: 358–361
- Shapiro, J. A., Charbit, A., Benson, S., Caruso, M., Laux, R., Meyer, R. y Banuett, F.** 1981. Perspectives for genetic engineering of hydrocarbon oxidizing bacteria. En: *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*. A. Hollaender (ed.). Plenum Press, Nueva York. pp. 243–272.
- Shaw B. G. y Latty, J. B.** 1982. A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *Journal of Applied Bacteriology*, **52**: 219–228.
- Shewan, J. M., Hobbs, G. y Hodgkiss, W.** 1960. A determinative scheme for the identification of certain general of Gram-negative bacteria, with special reference to the *Pseudomonadaceae*. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**: 379–390. (citado por Suhren, 1989).
- Schokker, E. P. y van Boekel, M. A. J. S.** 1998. Mechanism and kinetics of inactivation at 40-70°C of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. *Journal of Dairy Research*, **65**: 261–272.

- Schokker, E. P. y van Boekel, M. A. J. S. 1999. Kinetics of thermal inactivation of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: influence of pH, calcium, and protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 1681–1686.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**: 76–85.
- Spiers, A. J., Buckling A. y Rainey P. B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, **146**: 2345–2350
- Stackebrandt, E. y Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**: 846–849.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. y Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*, **43**: 159–271.
- Stead, D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 281–295.
- Stepaniak, L., Birkeland, S. E., Sorhaug, T. y Vagias, G. 1987. Isolation and partial characterization of heat stable proteinase, lipase and phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens* P1. *Milchwissenschaft*, **42**: 75–79.
- Stepaniak, L. y Fox, P. F. 1983. Thermal stability of an extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *Journal of Dairy Research*, **50**: 171–184.

- Stepaniak, L. y Fox, P. F.** 1985. Isolation and characterization of heat stable proteinases from *Pseudomonas* isolate AFT 21. *Journal of Dairy Research*, **52**: 77–89.
- Stepaniak, L., Fox, P. F. y Daly, C.** 1982. Isolation and general characterization of a heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *Biochimica et Biophysica Acta*, **717**: 376–383.
- Suhren, G.** 1989. Producer microorganisms. En: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. R. C. McKellar (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 3–34.
- Thomas S. B. y Druce, R. G.** 1971. Psychrotrophic microorganism in butter – a review. II. *Dairy Ind*, **36**: 145–150. (citado por Suhren, 1989).
- Tomoeda, M., Inuzuki, Kubo, N. y Nokamura, S.** 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Bacteriology*, **95**: 1078–1089.
- Tyler, S. D., Strathdee, C. A., Rozee, K. R. y Johnson, W. M.** 1995. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *Pseudomonads* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S r RNA internal transcribed spacers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**(4): 448–453.
- Venugopal, V.** 1990. Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: a review. *Journal of Food Protection*, **51**(4): 341–350.
- Vermelho, A. B., Meirelles, M. N. I., Lopes, A., Petinate, S. D. G., Chaia, A. A. y Branquinha, M. H.** 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **91**(6): 755–760.

- Wandersman, C. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Molecular Microbiology*, **3**(12): 1825–1831.
- Wang, S. L. y Chio, S. H. 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 629–633.
- Weidner, S., Arnold, W. y Pühler, A. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environment Microbiology*, **62**: 766–771.
- West, F. B., Adams, D. M. y Speck, M. L. 1978. Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra high temperature sterilized skim milk by a low temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, **61**: 1078–1084.
- Whooley, M. A., O'Callaghan, J. A. y McLoughlin, A. J. 1983. Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Journal of General Microbiology*, **129**: 981–988.
- Whyte, L. G., Bourbonnière, L. y Greer, C. W. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Applied and Environment Microbiology* **63**(9): 3719–3723.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S. y Di Giovanni, G. D. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas*

- (*sensu stricto*) in environmental samples. *Applied and Environment Microbiology*, **64**(7): 2545–2553.
- Williams, A.** 1995. Overview of conventional chromatography. En: *Current protocols in proteins science*. John Wiley & Sons. Inc. Unit 8.1.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Review*, **51**: 221–271.
- Worsey, M. J. y Williams, P. A.** 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid, *Journal of Bacteriology*, **124**: 7–13.
- Wubbolts, M. C. y Witholt, B.** 1998. Plasmids. En: *Pseudomonas*. T. C. Montie (Ed). Plenum Press, Nueva York, E. U. pp. 1–33.
- Yan, L., Langlois, B. E. y O’Leary, J.** 1985. Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs. *Journal of Dairy Science*, **68**: 1323–1336.
- Yen, K. M. y Gunsalus, I. C.** 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79**: 874–878.
- Yen, K. M., Sullivan, M. y Gunsalus, I. C.** 1983. Electron microscope heteroduplex mapping of naphthalene oxidation gene on the NAH7 and SAL1 plasmids. *Plasmid*, **9**: 105–111.
- Zhou, X., George, S. E., Frank, D. W., Urley, M., Gilmour, I., Krogfelt, K. A., Claxton, L. D. Laux, D. C. y Cohen, P. S.** 1997. Isolation and characterization of an attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* AC869, a 3,5-dichlorobenzoate degrader. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(4): 1389–1395.

## Anexo I.

### Medios de cultivo.

#### Medio F.

---

Peptona de caseína	10 g
Peptona de carne	10 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
Agar bacteriológico	12 g
Glicerol	10 g
Agua destilada	1000 mL

---

#### Medio Trypticaseína y soya (TSA).

---

Trypticaseína y soya (Difco)	30 g
Peptona de caseína	17 g
Peptona de soya	3 g
D (+) – Glucosa	2.5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 mL

---



**Caldo Trypticaseína y soya (TSB).**

---

Trypticaseína y soya (Difco)	30 g
Peptona de caseína	17 g
Peptona de soya	3 g
D (+) – Glucosa	2.5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
Agua destilada	1000 mL

---

**Caldo L.**

---

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Agua destilada	1000 mL
Ajuste del pH a 7.0	

---

**Caldo Nutritivo (CN).**

---

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000 mL
Ajuste del pH a 7.0	

---

**Medio de caseína (Molin y Ternström, 1982).**

---

Leche descremada en polvo	10 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 mL

---

## Anexo II.

### Soluciones y Reactivos.

#### Solución de caseína 1%.

Para la preparación de 100 mL de solución de caseína al 1%, se pesó 1 g de caseína y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM-CaCl<sub>2</sub> 3 mM pH 7.5. se homogenizó en frío mediante una barra magnética y agitación suave por 10 min. Posteriormente, el matraz tapado se colocó en baño maría en ebullición por 20 min con agitación suave. Una vez disuelta la caseína, la solución se enfrió sumergiendo el matraz en agua a temperatura ambiente para clarificar la solución. La solución se conservó bien en refrigeración por una semana.

Tabla 14. Relación de volúmenes para cada muestra experimental.

Muestra	Caseína 1% ( $\mu$ L)	Extracto enzimático ( $\mu$ L)
Blanco	500	0
Testigo <sup>a</sup>	475	25
Muestra	475	25

<sup>a</sup> La adición de la alícuota de extracto enzimático se hizo al final del tiempo de reacción.

Tabla 15. Relación de valores de pH, sustrato y amortiguadores para la determinación de pH máximo de actividad enzimática.

pH	Sustrato	Amortiguador 50 mM - CaCl <sub>2</sub> 3 mM
4 y 5	Hemoglobina	Acido acético - NaOH
6 y 7	Caseína	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - NaOH
7.5 y 8	Caseína	Tris - HCl
9, 10 y 11	Caseína	Glicina - NaOH

Tabla 16. Relación de soluciones amortiguadoras empleadas en la determinación de pH máximo de actividad enzimática.

Valor de pH	Sol. amortiguadora patrón 0.1 M
2, 2.5 y 3	Glicina - HCl
4 y 5	ácido acético - NaOH
6 y 7	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - NaOH
7.5 y 8	Tris - NaOH
9, 10 y 11	Glicina - NaOH
12 y 12.5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - NaOH

Tabla 17. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de iones e inhibidores.

Conc. final (mM)	Vol de EE <sup>a</sup> ( $\mu$ L)	Vol. de soln patrón 20 mM ( $\mu$ L)	Vol. H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Vol. total ( $\mu$ L)
1	100	10	90	200
2	100	20	80	200
3	100	30	70	200
5	100	50	50	200
10	100	100	0	200

<sup>a</sup> EE: Extracto Enzimático.

Tabla 18. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de SDS.

Conc. final (%)	Vol de EE ( $\mu$ l)	Vol. de soln patrón 0.5% ( $\mu$ l)	Vol. H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Vol. total ( $\mu$ l)
0.025	100	10	90	200
0.05	100	20	80	200
0.1	100	40	60	200
0.25	100	100	0	200

Tabla 19. Volúmenes de soluciones patrón necesarias para obtener las diferentes concentraciones de urea.

Conc. final (M)	Vol de EE ( $\mu$ l)	Vol. de soln patrón 20 mM ( $\mu$ l)	Vol. H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Vol. total ( $\mu$ l)
1	100	25	75	200
2	100	50	50	200
3	100	75	25	200
4	100	100	0	200

Tabla 20. Relación de volúmenes para el tratamiento con naranja de acridina.

No. Vial	Caldo L (mL)	Soln patrón del colorante (mL) <sup>1</sup>	Concentración final del colorante ( $\mu$ g/mL)
0	0.5	0	0
1	0.4918	0.0082	10
2	0.458	0.042	50
3	0.417	0.083	100
4	0.375	0.125	150
5	0.335	0.165	200
6	0.297	0.207	250
7	0.25	0.25	300

<sup>1</sup> Se preparó una solución patrón de 600  $\mu$ g/mL. Debido a que el experimento se realizó por duplicado para cada punto y para dos cepas se requirió un volumen de 5 mL y 3 mg del colorante.

Tabla 21. Reactivos para la etapa de amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S.

Reactivo	Cantidad
Mezcla maestra de RCP <sup>2</sup> .	45 µL
Oligonucleótido Ps-for (en 2.5 mL de H <sub>2</sub> O).	200 nM
Oligonucleótido Ps-rev (en 2.5 mL de H <sub>2</sub> O).	200 nM
ADN (1/50).	2.5 µL

<sup>2</sup> Mezcla maestra de RCP (ABgene. Advanced Biotechnologies Ltd, Epsom, Gran Bretaña). contiene:

- Taq ADN Polimerasa 1.25 unidades.
- Tris-HCl 75 mM (pH 8.8 at 25°C).
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM.
- MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM.
- Tween 20 0.01% (v/v)
- dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0.2 mM de cada uno.

Tabla 22. Condiciones de amplificación con oligonucleótidos Ps-for y Ps-rev.

Ciclos	Desnaturalización	Alineación	Polimerización
Primer ciclo	5 min a 95°C	8 s a 66°C después 1 min a 68°C	10 s a 74°C después 1 min a 72°C
Ciclos subsecuentes	11 s a 94°C después 15 s a 92°C	8 s a 66°C después 1 min a 68°C	10 s a 74°C después 1 min a 72°C
Último ciclo	11 s a 94°C después 15 s a 92°C	8 s a 66°C después 1 min a 68°C	10 min a 72°C

Fuente: Widmer y col., 1998.

Tabla 23. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para los diferentes tratamientos.

Medio	Inductor	Crecimiento		Actividad	
		B52	C61	B52	C61
TSB	–	8.86 / <b>A, B</b>	8.61 / <b>B, C</b>	0.755 / <b>D, E, F</b>	0.074 / <b>K</b>
	1 mM	8.98 / <b>A</b>	9.02 / <b>A</b>	0.702 / <b>E, F</b>	0.889 / <b>E, F, G</b>
	3 mM	8.53 / <b>B, C</b>	8.41 / <b>C, D</b>	1.22 / <b>A, B</b>	1.532 / <b>B</b>
	5m M	8.12 / <b>D, E, F</b>	7.86 / <b>F, G</b>	1.31 / <b>A</b>	1.78 / <b>A</b>
	0.2%	8.32 / <b>C, D, E</b>	8.42 / <b>C, D</b>	0.85 / <b>C, D, E</b>	0.493 / <b>I, J</b>
	0.4%	6.97 / <b>H</b>	6.87 / <b>H</b>	0.98 / <b>C</b>	1.315 / <b>C, D</b>
BHI	–	8.56 / <b>B, C</b>	8.45 / <b>C, D</b>	0.08 / <b>I</b>	0.032 / <b>K</b>
	1 mM	8.54 / <b>B, C</b>	7.99 / <b>E, F, G</b>	0.193 / <b>I</b>	0.397 / <b>J</b>
	3 mM	7.79 / <b>F, G</b>	7.67 / <b>G</b>	0.077 / <b>I</b>	0.90 / <b>E, F</b>
	5m M	6.79 / <b>H</b>	6.71 / <b>H</b>	0.176 / <b>I</b>	1.18 / <b>D</b>
	0.2%	8.37 / <b>C, D, E</b>	7.71 / <b>G</b>	0.476 / <b>G, H</b>	0.637 / <b>H, I</b>
	0.4%	4.43 / <b>I</b>	4.45 / <b>I</b>	0.936 / <b>C, D</b>	1.46 / <b>B, C</b>
CN	–	1.9 / <b>J, K</b>	1.25 / <b>M</b>	0.032 / <b>I</b>	0.022 / <b>K</b>
	1 mM	2.14 / <b>J, K</b>	1.36 / <b>M</b>	0.044 / <b>I</b>	0.037 / <b>K</b>
	3 mM	1.77 / <b>K, L</b>	1.39 / <b>M</b>	0.039 / <b>I</b>	0.066 / <b>K</b>
	5m M	2.185 / <b>J</b>	1.86 / <b>K, J</b>	0.052 / <b>I</b>	0.096 / <b>K</b>
	0.2%	1.46 / <b>L, M</b>	0.46 / <b>N</b>	0.087 / <b>I</b>	0.111 / <b>K</b>
	0.4%	0.65 / <b>N</b>	0.0 / <b>O</b>	0.15 / <b>I</b>	0.173 / <b>K</b>



## Anexo III.

**Sistema Minipreps** (Wizard Plus Midipreps, DNA Purification System, Promega, Madison, E. U.).

Se inoculó una colonia aislada en 100 mL de medio TSB y se incubó a 20 °C y 150 rpm por 16 h. Se obtuvo un precipitado celular por centrifugación a 12000 g por 10 min y se lavó 2 veces con agua ultrapura. El precipitado celular se resuspendió con 3 mL de la solución resuspendora de células, proporcionada en el sistema, seguido de la adición de 3 mL de la solución de lisis celular, igualmente proporcionada en el sistema, y se agitó suavemente hasta obtener una solución viscosa y transparente.

Se añadieron 3 mL de la solución neutralizante y se centrifugó por 5 min hasta obtener un lisado claro, el cual se transfirió a un microtubo nuevo y se mezcló con 10 mL de resina purificadora de ADN, la mezcla se transfirió a una columna, la cual estaba conectada a un contenedor con una capacidad de 20 mL. Mediante una bomba peristáltica se hizo el vaciado de la columna. Se lavó la columna con 2 mL de solución amortiguadora de lavado, proporcionada en el sistema. Posteriormente, la columna se separó del contenedor y se centrifugó por 20 seg a 12000 g para eliminar el excedente de lavado, obteniéndose una resina seca. Para eluir el ADN plasmídico se añadieron 300 µl de amortiguador TE (Tris 25 mM pH

8.0. EDTA 10 mM. Glucosa 5 mM), previamente calentado a 65°C a la columna y se dejó en reposo por 1 min. posteriormente se centrifugó por 20 seg a 12000 g eluyendo de esta forma los plásmidos. EL ADN plasmídico se almacenó a -20°C.

### **Minipreparación de ADN plasmídico (Sambrook y col., 1989).**

#### *Cosecha.*

Se transfirió una colonia aislada, de cada una de las cepas, a 2 mL de medio LB en un tubo de 15 mL. Se incubaron los cultivos por la noche a 20°C con agitación vigorosa. Posteriormente se colocaron 1.5 mL del cultivo en un tubo de microcentrifuga, y se centrifugó a 12000 g por 30 seg a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se dejó el tubo en una posición invertida sobre una toalla de papel permitiendo que el fluido drenara.

#### *Lisis alcalina.*

El precipitado celular se resuspendió en 100 µL de la *Solución I* previamente enfriada en hielo por agitación vigorosa (vortex). Posteriormente se añadieron 200 µL de *Solución II* (preparación fresca). Se cerraron los tubos, y se mezcló el contenido por inversión rápida de los tubos cinco veces.

A la preparación obtenida se le añadieron 150 µL de *Solución III*, previamente enfriada en hielo (la solución resultante fue 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato). Se cerró el tubo y mezcló suavemente mediante movimientos de inversión para dispersar la

*Solución III* en el lisado viscoso. El tubo se almacenó en hielo por 5 min, seguido de una centrifugación a 12000 g por 5 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se añadió un volumen igual de *fenol-cloroformo*. Se mezcló en vortex. Después de centrifugar a 12000 g por 2 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

La doble cadena de ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente y se mezcló por vortex. Se dejó la mezcla en reposo por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4 °C.

Se eliminó el sobrenadante y se dejó el tubo en una posición invertida sobre una toalla de papel permitiendo que el fluido drenara. Se eliminaron las gotas adheridas a la pared del tubo. El precipitado obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 70% a 4 °C, se eliminó el sobrenadante como se describió anteriormente, y se secó el precipitado al aire por 10 min.

Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 µL de TE (pH 8.0) conteniendo RNAasa pancreática (20 µg/mL) libre de ADNasas. Se mezcló brevemente por vortex y se almacenaron a -20 °C.

*Solución I:* Tris-HCl 25 mM con glucosa 5 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0

*Solución II:* NaOH 0.2 N (Dilución fresca de un patrón 10 N) con SDS 1%.

*Solución III:* Acetato de potasio, ácido acético glacial y agua desionizada (60 mL, 11.5 mL y 28.5 mL respectivamente).

**Procedimiento rápido para detección y aislamiento de plásmidos grandes y pequeños.**

(Kado y Liu 1981).

Las células se propagaron en 10 mL de caldo tripticaseína y soya (TSB) durante la noche (17 h) a 25°C y 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 ( $\lambda = 600$  nm), se colectaron las células por centrifugación a 4000 rpm, a temperatura ambiente por 5 min. El precipitado celular se resuspendió en 3 mL de la Solución I.

Las células se lisaron por adición de 6 mL de *Solución II*, se mezcló por agitación breve y se calentó a 55°C por 20 min en baño maría, seguido de la adición de 3 mL de una *Solución fenol-cloroformo* (1:1 v/v). La solución se emulsificó al agitar y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 4 °C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo con tapa de rosca usando una pipeta Pasteur de polietileno estéril de boca ancha o su equivalente, evitando tomar la interfase y el precipitado.

Se adicionaron 300  $\mu$ l de la Solución 3 (1/10 parte de la *solución de fenol-cloroformo*) y 7.5 mL de etanol frío a -20 °C (2 volúmenes de la solución obtenida). La solución se dejó en reposo a -20 °C durante la noche. Se centrifugó a 18 400 g por 10 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Beckman Allegra 64R con rotor F1010 (Palo Alto, California, E. U.). Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%, evitando que se desprenda

el precipitado, el cual fue muy compacto. Se eliminó el alcohol hasta sequedad (se puede utilizar aire caliente).

El precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de TE y se dejó en reposo 1 h a 4 °C. La muestra puede, en forma inmediata, ser usada para analizarla por electroforesis.

*Solución I:* 100 mL de Tris-acetato 40 mM, pH 7.9, EDTA sódica 2 mM, ajustado el pH con ácido acético glacial.

*Solución II:* Tris 50 mM, pH 12.6, SDS 3%, ajustado el pH con NaOH 2 N (aproximadamente 3.5 mL para 100 mL de solución).

*Solución III:* Acetato sódico 3 M pH 5.2 (CASAS).

*Solución fenol-cloroformo (1:1 v/v):* La solución de cloroformo (CIA) se preparó con 1 parte de alcohol isoamílico y 24 partes de cloroformo, se conservó a temperatura ambiente. La solución de fenol se preparó en equilibrio con Tris-acetatos 0.1 M, pH 8, EDTA 0.5 M y se conservó a -20 °C.