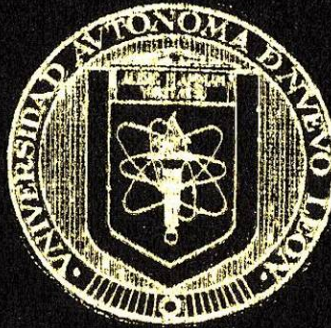


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE BACTERIAS
ACIDOLACTICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

CARLOS HERNANDEZ TORRES

MARIN, N. L.

DICIEMBRE DE 1995

TL

QR121

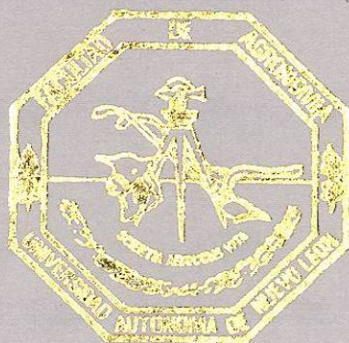
H47

c.1



1080072021

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE BACTERIAS
ACIDOLACTICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

CARLOS HERNANDEZ TORRES

MARIN, N. L.

DICIEMBRE DE 1995



012356

T
Q R121
H47

040.637

FA2

1995

C.5



(72021)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

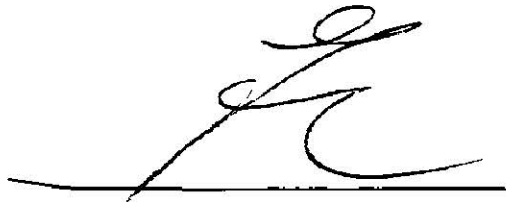
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

CARLOS HERNÁNDEZ TORRES

COMISIÓN REVISORA




Ph.D. RIGOBERTO GONZALEZ.

Asesor Principal



Dr. MARIO A. RAMIREZ.

Asesor Estadístico



ING. EDGAR REYES MELO

Asesor Auxiliar

DEDICATORIAS

A mis padres:

Francisco Hernández González.

Aurelia Torres Hernández.

Quienes a base de esfuerzos y grandes sacrificios, lucharon por darme una educación digna; y a quienes espero no defraudar.

A mis hermanos:

Juan, José Pedro, Jorge, Félix y Pablo .

Por el cariño que nos une.

"A todos aquellos que luchan por una vida mejor"

AGRADECIMIENTOS

A dios:

Por permitirme realizarme como persona.

A mis asesores:

Ph.D. Rigoberto González González.

Dr. Mario Alberto Rodríguez de la Garza.

Ing. Edgar Reyes Melo.

Por su valiosa colaboración, apoyo y orientación incondicional, no solamente en la realización del presente trabajo, sino a lo largo de toda la carrera.

A la Biol.: Juana Aranda.

Por su apoyo y orientación incondicional en la realización de la presente investigación.

A mis amigos y compañeros:

Por todos los momentos compartidos.

A la memoria de:

José Trinidad Betancourt Pérez (†).

Marcial Sanchez Pavon (†).

Quienes, durante su instancia mostraron una amistad digna de admiración.

A los maestros:

Por su afan de formar profesionistas capaces de enfrentar la problemática de un mundo en constante cambio.

Al personal que labora en ésta facultad:

Que con su participación indirecta hacen posible la formación de profesionistas, en especial al personal de la biblioteca.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. ENZIMAS.....	3
2.1.1. Historia	3
2.1.2. Usos generales	3
2.1.2.2. Desarrollo del uso industrial de proteasas microbianas	4
2.1.3. Cinética enzimática.....	5
2.1.3.1. Efecto del pH sobre actividad enzimática.....	5
2.1.3.2. Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.....	6
2.1.3.3. Efecto del tiempo sobre la actividad enzimática.....	7
2.1.4. Clasificación	7
2.1.4.1. Oxidoreductasas.....	8
2.1.4.2. Transferasas	9
2.1.4.3. Hidrolasas	9
2.1.4.4. Liasas	10
2.1.4.5. Isomerasas	10
2.1.4.6. Ligasas	11
2.2. BACTERIAS ACIDOLACTICAS	11
2.2.1. Clasificación de las bacterias acidolácticas.....	12
2.2.2. Características de las bacterias acidolácticas	13
2.3. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS	15
2.3.1. Proteínas	15

2.3.1.1. Cadena de péptidos.....	15
2.3.1.2. Grupo prostético	16
2.3.1.3. Síntesis de proteínas	16
2.3.1.4. Albúmina sérica bovina.....	17
2.3.2. Protéolisis enzimática	17
2.3.2.1. Degradación de los componentes protéicos.....	18
2.3.3. Factores que alteran la actividad proteolítica de los microorganismos adicionados a la leche con fines de industrialización:	19
III. MATERIALES Y METODOS	20
3.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.....	20
3.1.1. Reactivos.....	20
3.1.2. Curva estándar	22
3.1.3. Actividad Proteolítica de las bacterias.....	24
3.1.4. Cálculos.....	25
3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	26
3.2.1. Reactivos.....	26
3.2.2. Curva estándar	27
3.2.3. Proteína de las bacterias.....	27
3.2.4. Cálculos	27
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
3.3.1. Actividad proteolítica a diferente pH.....	29
3.3.2. Actividad proteolítica a diferente temperatura	29
3.3.3. Actividad proteolítica a diferente tiempo	29
IV.RESULTADOS	30
4.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.....	30
4.1.1. Curva estándar	30

4.1.2. Actividad proteolítica de las bacterias, bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación.....	36
4.1.3. Actividad proteolítica de las bacterias bajo condiciones óptimas.....	45
4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS BACTERIAS.....	46
4.2.1. Curva estándar	46
V. DISCUSIONES.....	49
5.1. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	49
5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	50
VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. RESUMEN.....	56
BIBLIOGRAFÍA	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Usos generales de las principales enzimas producidas comercialmente.	4
Cuadro 2. Distribución principal del género <i>Lactobacillus</i>	12
Cuadro 3. Distribución principal del género <i>Streptococcus</i>	13
Cuadro 4. Reactivos utilizados para la determinación de la actividad proteolítica.....	21
Cuadro 5. Condiciones bajo las cuales se realizaron las diferentes curvas estándar.	22
Cuadro 6. Esquema general, para la determinación de las condiciones óptimas de análisis de la actividad proteolítica de las bacterias.....	23
Cuadro 7. Composición del agar láctico o caldo lactosado.....	24
Cuadro 8. Reactivos utilizados para la determinación de proteína.....	26
Cuadro 9. Curva estándar de proteína.	27
Cuadro 10. Densidad óptica a 280 nm. de la pepsina bajo las diferentes condiciones.	30
Cuadro 11. Densidad óptica de la papaína bajo las diferentes condiciones.	32
Cuadro 12. Resumen general, de las diferentes condiciones de análisis para la determinación de la actividad proteolítica de las bacterias.....	35
Cuadro 13. Actividad proteolítica a pH óptimo de cada una de las bacterias (buffer 2).	38
Cuadro 14. Actividad proteolítica a pH óptimo de cada una de las bacterias (buffer 3).	39
Cuadro 15. Actividad proteolítica a temperatura óptima, para cada una de las bacterias, utilizando el buffer 2.....	41
Cuadro 16. Actividad proteolítica a temperatura óptima, para cada una de las bacterias, utilizando el buffer 3.....	42

Cuadro 17. Actividad proteolítica de cada una de las bacterias al tiempo óptimo, utilizando el buffer 3.....	44
Cuadro 18. Resumen del análisis de varianza de cada una de las variables analizadas.....	45
Cuadro 19. Actividad proteolítica de las bacterias, bajo condiciones óptimas.	46
Cuadro 20. Densidad óptica a 660 nm. utilizando como estándar diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino.....	46
Cuadro 21. Actividad proteolítica real de las bacterias (APR).....	48
Cuadro 22. pH óptimo para cada una de las bacterias reportado por Akuzawa y colaboradores.	49
Cuadro 23. Temperatura óptima para cada una de las bacterias, reportada por Akuzawa y colaboradores.	50

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Curva estándar de la pepsina utilizando como sustrato caseína con el buffer 1.....	31
Fig. 2. Curva estándar de la pepsina utilizando como sustrato albúmina con el buffer 2.....	31
Fig. 3. Curva estándar de la pepsina utilizando como sustrato albúmina y el buffer 3.....	32
Fig. 4. Curva estándar de papaína utilizando como sustrato caseína y el buffer 1.....	33
Fig. 5. Curva estándar de papaína utilizando como sustrato albúmina y el buffer 1.....	34
Fig. 6. Comportamiento de la actividad proteolítica de las bacterias tanto centrifugadas como no centrifugadas.....	37
Fig. 7. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente pH utilizando el buffer 1.....	40
Fig. 8. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente pH utilizando el buffer 3.....	40
Fig. 9. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente temperatura utilizando el buffer 2.....	42
Fig. 10. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente temperatura utilizando el buffer 3.....	43
Fig. 11. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente tiempo de incubación utilizando el buffer 3. ..	44
Fig. 12. Curva estándar de proteína.....	47

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el uso de enzimas en los procesos industriales, ha sido de gran importancia a nivel mundial; tanto que numerosas investigaciones se han desarrollado, principalmente en los Estados Unidos de América y Japón; en su mayoría encaminadas a encontrar nuevas fuentes, así, como nuevas aplicaciones generalmente de enzimas ya conocidas, siendo en gran parte de origen microbiano, ya que suelen ser procesos de purificación más económicos, obteniéndose en ocasiones mayores rendimientos que utilizando enzimas provenientes de fuentes vegetales o animales. Por lo que la industria de la fermentación ha desarrollado nuevos y numerosos métodos para la producción de enzimas proteolíticas altamente puras a bajo costo; principalmente provenientes de fuentes microbianas, esto debido a que los procesos proteolíticos forman parte de muchas operaciones importantes en la industria en general (en la elaboración de detergentes; en la industria cárnica como ablandadores; en la medicina, para la elaboración de antibióticos; como una ayuda en la digestión; en la industria láctea, en la elaboración de quesos; etc.).

La presente investigación surge, de la necesidad de encontrar una nueva aplicación de las bacterias acidolácticas las cuales son comunmente utilizadas en la industria láctea, principalmente en la elaboración de yogurt; además de que en la actualidad se les atribuye ciertas propiedades de conservador en carnes; considerando dichas aplicaciones, es de suponer que poseen enzimas de carácter proteolítico (hidrolizan proteínas); por lo que la investigación se planteó con la finalidad de cuantificar la actividad proteolítica de algunas bacterias lácticas (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Streptococcus termóphilus*, *S. lactis* y *S. crémoris*), bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación. La cual contribuye además , con el propósito de encontrar nuevas fuentes de enzimas proteolíticas de origen microbiano, que sean capaces de substituir algunas enzimas de origen animal o vegetal, como lo son la papaína (ablandador) o la

pepsina (contribuye en la digestión); así como el de encontrar nuevas aplicaciones de dichas bacterias en la industria de la fermentación en general.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ENZIMAS

2.1.1. Historia

Las enzimas se definen como catalizadores coloidales orgánicos generalmente solubles en agua, es decir, son proteínas con propiedades catalíticas debido a su poder de activación específico; las cuales pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano, capaces de actuar tanto en el interior de la célula como en el exterior de ésta.

Desde 1836 Berzelius propuso el término catalizador para aquellas sustancias capaces de poner en marcha afinidades latentes, a una temperatura determinada en virtud solo de su presencia. En 1926 Sumner aisló y cristalizó la ureasa de las habas, una enzima que degrada la urea a CO_2 y NH_3 . En 1930 Northrop cristalizó y purificó la pepsina; en los últimos 60 años se ha incrementado considerablemente el número de enzimas aisladas y purificadas siendo principalmente de origen microbiano. Para 1969, el 80 % de todos los detergentes contenían enzimas, principalmente proteasas; pero para 1971 el uso de éstas enzimas se redujo considerablemente debido a las alergias entre los trabajadores de producción y consumidores. (BRAVERMAN, 1980)(DIXTON, 1979).

2.1.2. Usos generales

En el cuadro 1 se muestran algunas de las enzimas que son actualmente producidas en forma comercial y su principal utilización.

Cuadro 1. Usos generales de las principales enzimas producidas comercialmente.

USOS	ENZIMAS
En la industria.	Amilasas, Proteasas, Catalasas, Isomerasas y Penicilina-ascilasas.
Enzimas usadas para objetivos analíticos.	Glucosaoxidasa, Galactosaoxidasa, Hexiquinasa, Alcoholdehidrogenasa, Muramidasa y Colesteroloxidasa.
Enzimas usadas en la medicina.	Asparginasa, Proteasas, Lipasas y Estreptoquinasas.
Enzimas usadas en la industria alimentaria.	<p>a) Enzimas de origen vegetal: Diastasa, Papaina, Bromeína y la Ficina.</p> <p>b) Enzimas de origen animal: de éstas las más utilizadas son las enzimas pancreáticas como lo son, la Pepsina, la Catalasa y la Renina.</p> <p>c) Enzimas microbianas: Invertasa, Amiloglucosidasa, Pectinasas, Glucosaoxidasa, la Catalasa y las Proteasas principalmente de hongos como el <i>Aspergillus niger</i>.</p>

(MILLER, 1976)(CRUEGER, 1982).

2.1.2.2. Desarrollo del uso industrial de proteasas microbianas

La producción de enzimas proteolíticas microbianas en una escala industrial fue iniciada por el japonés Takamine, quién, en 1890 instalado en U.S.A inició la producción de la preparación de la enzima Takadiastasa, este producto fue realizado por fermentación semisólida de *Aspergillus oryzae*, basado en la tecnología japonesa tradicional mejorada por Takamine, al saber del uso de salvado de trigo en lugar de arroz como componente principal. La Takadiastasa fue principalmente una preparación alfa amilasa y comercializada como tal, pero esta contenía una gran cantidad de proteasa siendo dentro de poco recomendada para varias aplicaciones, principalmente como una ayuda en la digestión. En 1913, Boidin y Efront desarrollaron en Francia un proceso para la preparación de enzima de *Bacillus subtilis*, la cual contenía una actividad proteolítica similar a la Takadiastasa.

En el desarrollo después de la segunda guerra mundial, la tecnología de fermentación sumergida, para la producción de antibióticos fue adoptada por la industria de las enzimas. La venta de proteasas microbianas fue, sin embargo limitada hasta que se introdujo alrededor de 1960 en el uso de detergentes; el uso de enzimas en detergentes inició en 1913 cuando el doctor Röhöm en Alemania invento un agente de prelavado que contenía carbonato de sodio y enzimas pancreáticas. Para 1969, más del 50 % de todos los detergentes manufacturados en Europa y en los Estados Unidos de América, contenían enzimas proteolíticas; siendo la proteasa de *B. licheniformis* la enzima microbial más importante desde el punto de vista económico. En 1971, los investigadores sobre el uso de enzimas en detergentes bajo la dirección de la Academia Nacional de Ciencias revelaron que el uso excesivo de dichas enzimas ponían en riesgo la salud tanto del consumidor como a la de los trabajadores de las fabricas de este tipo de detergentes, por lo que disminuyó drásticamente la producción de estas enzimas. (ROSE, 1980).

2.1.3. Cinética enzimática

El objetivo de la cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento, establece la relación que existe entre la velocidad de reacción enzimática y las concentraciones del substrato y de la enzima así como la influencia de algunos factores: pH, temperatura, presencia de efectores y eventualmente actividad del agua. Se define como actividad enzimática la cantidad de enzima que transforma un mol de substrato por segundo bajo las condiciones experimentales estándares. (SCRIBAN, 1985).

2.1.3.1. Efecto del pH sobre actividad enzimática

La relación entre pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del substrato, así como de otros muchos

factores que son difíciles de cuantificar. La forma de la curva de actividad - pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de K_m (constante de Michaelis) de muchos enzimas varía con el pH. (LEHNINGER, 1972).

Entre los residuos de los aminoácidos de la molécula enzimática que poseen agrupamientos ionizables, algunos se unen al sustrato y van a posicionarlo, otros van a participar en la reacción y la mayor parte sirven para mantener la conformación de la enzima. Estos residuos, como el sustrato, en muchos de los casos, son sensibles al pH y tienen diferentes estados de ionización de acuerdo al valor de pH. Se comprende entonces que cuando un grupo $-COO^-$ del sitio activo es necesario para la fijación del sustrato, la disminución del pH del medio ocasiona su transformación en $-COOH$ que ya no permite la fijación del sustrato y por ende la actividad de la enzima. (SCRIBAN, 1985).

2.1.3.2. Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica, aproximadamente, por cada 10°C de aumento de la temperatura ($Q_{10} \approx 2.0$). Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia poseer una temperatura óptima, la variación que se observa al representar la actividad catalítica frente a la temperatura es el resultado de dos efectos antagónicos, por una parte el aumento de la agitación de las moléculas al elevarse la temperatura, que aumenta la frecuencia de las colisiones entre el sustrato y la enzima; y por otra parte la desnaturalización (temperaturas por encima de 50 a 60°C , e inclusive existen enzimas que soportan temperaturas de 80°C) que va a modificar las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína globular y origina el paso de la enzima de una conformación activa a una

conformación desprovisiva de actividad; en este caso el efecto más pronunciado es debido a la pareja tiempo-temperatura, es decir, la duración y la intensidad del tratamiento térmico.(SCRIBAN, 1985)(LEHNINGER, 1972).

2.1.3.3. Efecto del tiempo sobre la actividad enzimática.

El tiempo es uno de los factores más importantes en las aplicaciones enzimáticas; debido a que las velocidades iniciales de las reacciones enzimáticas son usualmente muy rápidas, pero conforme la reacción procede, la velocidad disminuye. Esto puede ser debido a varias razones, las más importantes son la exhaustión del sustrato y la inhibición de la reacción por los productos finales.(MILLER, 1976).

2.1.4. Clasificación

La clasificación y nomenclatura de las enzimas arregla las enzimas en grupos con procesos de catálisis similares, con subgrupos que especifican con más precisión la reacción catalizada; en general, cada enzima tiene un nombre el cual consiste en: el nombre del sustrato, la terminación "asa", debido a la complejidad de varios sustratos dicho método presentaba el inconveniente de nombres extremadamente largos; para lo cual, la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica propuso, la modificación de dicho sistema en un sistema trivial para uso común.(DIXTON, 1979)(SCRIBAN, 1985).

Actualmente a las enzimas se les asigna un número clave individual, basado en su clasificación y son en la actualidad muy utilizados y consisten en un prefijo EC. (número sistemático de la Comisión de Enzimas) y 4 números separados por puntos.

i) El primer número que indica la reacción catalizada y divide a las enzimas en 6 clases principales:

1.- Oxidoreductasas.

2.- Transferasas.

3.- Hidrolasas.

4.- Liasas.

5.- Isomerasas.

6.- Ligasas.

ii) El segundo número indica las subclases, que corresponden al sustrato en general o grupo envuelto.

iii) El tercer número indica las sub-subclases, las cuales corresponden al sustrato específico o coenzima.

iv) El cuarto número indica las sub-sub-subclases; las cuales corresponden al número serial de la enzima.

2.1.4.1. Oxidoreductasas

Las oxidoreductasas, son enzimas que catalizan la transferencia de átomos de hidrógeno u oxígeno. A esta clase pertenecen todas las enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. El sustrato que es oxidado, es considerado como donante de hidrógeno y el nombre sistemático es donante:aceptor oxidoreductasa. Estas enzimas se relacionan con las reacciones biológicas de oxidación y reducción y por lo tanto con la respiración y procesos de fermentación. El nombre recomendado en la mayoría de los casos, es deshidrogenasa, aunque reductasa es en ocasiones una forma alternativa. El nombre oxidasa solamente es utilizado donde el O_2 es el aceptor. Sin embargo la clase no incluye solo deshidrogenasas y oxidasas, sino también peroxidasas, las cuales utilizan H_2O_2 como el oxidante y las oxigenasas e hidrolasas que incorporan oxígeno molecular.

2.1.4.2. Transferasas

Las transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de grupos específicos, es decir, transfieren un grupo de un compuesto a otro compuesto, por ejemplo el grupo metil o un grupo glicosil. Los nombres sistemáticos son formados de acuerdo al grupo transferasa aceptor o grupo transferasa donante. En la mayoría de los casos, el donante es un cofactor (coenzima) cargado con el grupo a ser transferido.

2.1.4.3. Hidrolasas

Son enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas de los enlaces de tipo éster, éter peptídico, glucosilo, anhídrido de ácido, C - C halógeno o P - N; dentro de las cuáles se encuentran las enzimas que actúan sobre los enlaces peptídicos (subgrupo 3.4.), que a su vez contienen un subgrupo de peptidopeptidohidrolasas (sub-subgrupo 3.4.4); en donde se encuentran la pepsina (EC.3.4.4.1) cuya reacción principal es la hidrólisis de los L - Péptidos que separan los residuos N - terminales con un grupo α - amino libre, especialmente cuando el residuo N terminal es leucina u otro aminoácido parecido ; en éste subgrupo se encuentra también la papaina (EC.3.4.4.10), cuya reacción principal es la hidrólisis de péptidos, amidas, ésteres, etc., especialmente en los enlaces en que participan aminoácidos básicos o leucina. (HARPER, 1971).

Los conocimientos en relación a las enzimas peptidasas (proteolíticas) han tenido cambios considerables en los recientes años. Dichas enzimas pertenecen al subgrupo 3.4., de las cuales algunas proteasas atacan solamente moléculas grandes, mientras otras hidrolizan moléculas pequeñas. No todos los enlaces peptídicos son hidrolizados por todas las peptidasas; en algunas enzimas un grupo adyacente carboxil terminal o grupo amino puede ser incluso preventivo actuando por tales grupos, mientras que en otros requieren además un grupo terminal libre. La anterior puede actuar en medio de una cadena péptida, rompiendo moléculas de proteína en fragmentos más pequeños, pero generalmente

hidroliza solamente péptidos pequeños, si los grupos terminales son bloqueados artificialmente por medios químicos. Las endo y exo enzimas cooperan muy efectivamente en la digestión de proteína, en la que se expresa la función principal de lo anterior que se produce de un gran número de extremos libres en los cuáles pueden actuar. Los dos mismos tipos de acción pueden verse en los enzimas que asimilan polisacáridos, como los ilustrados por las alfa y beta amilasas. La clasificación de éstas enzimas presentan considerables dificultades. Las peptidasas o exopeptidasas se distribuyen entre los subgrupos 3.4.11-17 y se dividen en aminoácidos simples de cadenas peptídicas N-terminal o C-terminal, las cuales son específicos para substratos dipéptidos.

2.1.4.4. Liasas

Las liasas son enzimas que actúan sobre enlaces de C-C, C-C-O, C-N y otros vínculos por eliminación, dejando dobles vínculos, o a la inversa añadiendo grupos de doble enlace. En la mayoría de las clases, 2 moléculas de substrato son envueltas en reacción en una dirección, pero solamente una molécula en la reacción inversa. Muchas de éstas reacciones son muy importantes en la biosíntesis y cuando la reacción es demostrada solo biológicamente la enzima es conocida como una sintetasa.

2.1.4.5. Isomerasas

Racemasas y efimerasas: las racemizaciones pueden ser producidas por pares de enzimas específicas respectivamente por dos isómeros y produciendo un producto simétrico común.

2.1.4.6. Ligasas

Son enzimas que catalizan la reacción de unión de dos moléculas acopladas a la ruptura, sin intervención del agua, de un enlace pirifosfórico en el ATP o eventualmente en un nucleótido trifosfórico del mismo tipo.

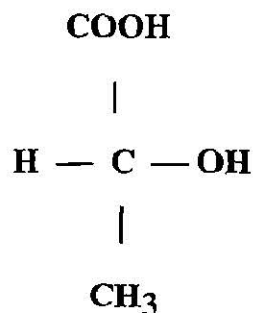
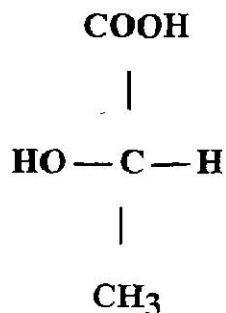
Las subclases corresponden al tipo de enlace que se establece (C – O, C – S, C – N, C – C) y la sub-subclases se refieren a la naturaleza del producto formado (amida, péptido, etc.) o a la reacción que es catalizada.(SCRIBAN, 1985).

2.2. BACTERIAS ACIDOLACTICAS

Las bacterias lácticas se caracterizan por su habilidad de transformar la glucosa en substratos adecuados y por lo general, una serie de otros azúcares en ácido láctico.

Como en la fermentación alcohólica, en la fermentación láctica se obtiene energía al sobrar dos moléculas de ácido adenosintrifosfórico (ATF), rico en energía. La fermentación láctica no sólo se produce en la naturaleza como consecuencia del metabolismo bacteriano, sino que también se verifica en el metabolismo anaerobio en la musculatura del hombre y de los animales; utilizando estos como fuente energía glucógeno y las bacterias utilizan glucosa.

Las bacterias lácticas se encuentran principalmente en las plantas y en las partes vegetales, encontrándose también en las mucosas y en la canal intestinal del hombre y de los animales. Las bacterias acido-lácticas poseen la enzima láctico- deshidrogenasa (LDH) que cataliza la síntesis de lactato a partir del ácido pirúvico (lactato es el ácido láctico procedente de la leche). Se pueden producir distintos isómeros de ácido láctico, L(+), D(-), los cuales difieren en la configuración del segundo átomo de carbono, siendo las siguientes:



(TAMIME, 1991).

2.2.1. Clasificación de las bacterias acidolácticas

En los cuadros 2 y 3 se muestra la clasificación de las bacterias acidolácticas. (BOTTAZZI, 1994).

Cuadro 2. Distribución principal del género *Lactobacillus*.

FAMILIA	GÉNERO	GRUPOS	SUBGRUPOS	BACTERIAS
Lactobacillaceae	Lactobacillus	Heterofermentativos	Mesófilos	L. brevis, L. reuteri,
			Termófilos	L. fermentatum. L. cellobiosus.
		Homofermentativos	Mesófilos	L. casei. L. plantarum.
			Termófilos	L. acidophilus, L. salivarius, L. kefveticus, L. bulgaricus, L. Láctis.

Cuadro 3. Distribución principal del género *Streptococcus*.

FAMILIA	GÉNERO	GRUPOS	SUBGRUPOS	BACTERIAS
Streptococaceae	Streptococcus	Homofermentativos	Mesófilos	S. láctis.
			Mesófilos-termófilos	S. faecium.
			Termófilos	S. Termóphillus.
	Leuconostoc	Heterofermentativos	Mesófilos	Leuc. crémoris. Leuc. láctis. Leuc. mesenteroides. Leuc. dextranicum.
		Homofermentativos	Termófilos	Ped. pentosaceus.
			Mesófilos	Ped. acidoláctic.

2.2.2. Características de las bacterias acidolácticas

***Lactobacillus bulgaricus*:** Son bacilos que miden de 2 a 5 micrómetros de largo, se encuentran aislados o en cadenas; la temperatura óptima es de 40 a 45 °C, la máxima es de 52 °C y la mínima 22 °C, fermenta la fructosa, glucosa y manosa; la bacteria en leches es capaz de producir más de un 2 % de ácido láctico.

***Lactobacillus acidophilus*:** La denominación acidífila conduce a errores pues esta bacteria no tolera más el ácido que otros lactobacilos, son bacilos que miden 2 a 6 micrómetros de largo, se encuentran aislados o en cadenas cortas, la temperatura óptima es de 37 °C y la máxima de 43 a 48 °C. Por debajo de los 20 °C no registra crecimiento; fermenta la sacarosa y por regla general la refinosa, produce en leche con autolizado de levadura hasta 2 % de ácido, se encuentra por lo general en el intestino y en las heces fecales del hombre (por lo general en niños) y de otros mamíferos.

Lactobacillus plantarum: Son bacilos que miden de 0.8 a 1 por 3 a 8 micrómetros y se encuentran aislados o en cadenas cortas; la temperatura óptima es de 34 a 37 °C; produce ácido láctico racémico. Esta bacteria se encuentra en la naturaleza, principalmente en partes vegetales; es capaz de formar acetilcolina la cuál se reconoce por el olor en el forra en el cual ha crecido. Aparece también de manera espontanea en la preparación de pepinillos en vinagre, chaocroust principalmente.

Streptococcus termóphillus: El *S. termóphillus* pertenece a la familia de los streptococos y esta clasificado en el grupo de cocos gram (+) del manual Beregey`s. Se desarrolla en leche utilizando como fuente de energía la lactosa y como fuente de nitrógeno la proteína de la leche. La temperatura óptima de crecimiento es de 44 °C. pero se desarrolla hasta en los 50 °C. resistente al tratamiento térmico de 60 °C durante 30 minutos, no se desarrolla a 10 °C., no es clasificable desde el punto de vista serológico, presenta alfa-hemolisis cuando es cultivado en agar-sangre, no produce catálisis.

La cantidad máxima de ácido láctico se produce en leche variando según el biotipo y esta comprendido entre el 0.8 y el 1.0 %. La actividad proteolítica es de tipo débil, pero varía de cepa a cepa; siendo una medida evidencial la enzima intracelular y la actividad caseinolítica y peptidasica. que liberan del sustrato de leche aminoácidos estimulantes de crecimiento de los estreptococos, producen ácido fórmico y dan treonina y acetaldheido.

El hábitat natural de estos microorganismos no es muy conocido mas ha sido aislado de paja, leche cruda, leche pasteurizada y en polvo mas que de otros productos de quesería.

S. láctis: son bacterias globulosas, casi siempre ovales, miden aproximadamente 0.5 por 1.0 micrómetros y aparecen en parejas en cadenas cortas. La temperatura óptima para el crecimiento es de 25 °C, la temperatura máxima es de 40 °C y la mínima de unos 5 °C., El *S. láctis* fermenta la latosa, maltosa y dextrina, pero no la sacarosa, es la bacteria que se encuentra con mayor frecuencia en la leche normal, puede producir en 24 hrs. de 0.5 a 0.7 % de ácido láctico en la leche y puede degradar caseína en escaso grado.(HANSEN, 1959).

2.3. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS

2.3.1. Proteínas

Las proteínas son componentes que se encuentran en todos los tejidos vivos, tanto animales como vegetales y bacterias. Desempeñan funciones indispensables en la arquitectura celular, en la catálisis, en la regulación metabólica y en los procesos contráctiles y constituyen un arma importante del arsenal defensivo de muchos organismos superiores. (MAHLER, 1971).

Las proteínas contienen cadenas de péptidos constituidas por aminoácidos unidos por enlaces de amida, se encuentran generalmente 20 aminoácidos diferentes en las proteínas y el orden de sucesión en el cual estos aminoácidos aparecen en el péptido "su estructura primaria" determina su forma y su asociación con otros péptidos y por ende las propiedades de la proteína. (GILVERY, 1970).

Se dividen en : a) proteínas simples o sencillas, que son las que por hidrólisis completa sólo originan alfa aminoácidos y sus derivados; b) proteínas conjugadas, que son aquellas en las que la molécula proteica se halla unida a un grupo orgánico no proteico.(MAHLER, 1971).

2.3.1.1. Cadena de péptidos

Las proteínas son moléculas grandes, macromoléculas y su tamaño es un atributo biológicamente importante porque impide que escapen de las células por la membrana del plasma. Las proteínas están compuestas de polipeptidos y un péptido es un compuesto formado por enlaces de amida, de cabeza a cola, entre alfa aminoácidos. Una proteína puede ser una sola cadena de péptidos larga, pero la mayoría de las proteínas están constituidas por varias cadenas de péptidos asociadas entre sí y estas cadenas no necesitan ser identificadas.

2.3.1.2. Grupo prostético

Los 20 aminoácidos tienen la necesaria diversidad de estructuras para construir las diferentes proteínas, pero no proporcionan todas las clases de grupos químicos necesarios para cada función biológica cumplida por las proteínas. Estos grupos son suministrados por péptidos apropiados que son elaborados de tal manera que se asociarán fuertemente con otros compuestos de bajo peso molecular que tienen la estructura deseada.

2.3.1.3. Síntesis de proteínas

La descripción del orden de aminoácidos necesarios para formar las cadenas de péptidos de proteínas está contenida en los ácidos nucleicos, los cuales constituyen el aparato genético de la célula. La fuente primaria es un ácido desoxirribonucleico (DNA); el cual se reproduce por generaciones de células en división. El DNA consiste de un esqueleto de ésteres fosfatos de azúcares con cadenas laterales de bases nitrogenadas; las purinas y pirimidinas; cada aminoácido está especificado por combinaciones de tres de éstas bases, esta combinación es un codon. La ordenación completa de codones necesaria para especificar una cadena de péptido es un cistrón.

El DNA esta presente en la mayoría de las células como un doble filamento enrollado formando un hélice; uno de los filamentos en la fuente, activa la información de la célula; el otro sirve como una matriz para la formación del nuevo filamento activo por división celular. El filamento activo es utilizado como una plantilla para hacer otra clase de ácido nucleico, ácido ribonucleico mensajero (RNAm), el cual transporta la clave de uno o más cistrones desde el núcleo a la sede de síntesis de proteína en el citoplasma.

Los aminoácidos son identificados para fines de la síntesis de proteínas por una combinación con RNA de transferencia (RNAt), los cuales son específicos para cada aminoácido en particular y se combinan con el codon en el RNAm que designa ese aminoácido. Una vez que el RNAt se une con RNAm en un ribosoma, una cadena de

péptido en crecimiento es agregada al nuevo aminoácido transportado por el RNAt, con el cual se alarga la cadena en un residuo. El proceso de transferencia se repite hasta que la cadena se completa. Las cadenas liberadas se combinan entonces espontáneamente para formar moléculas de proteínas acabadas, con todos los grupos prostéticos necesarios unidos.(GILVERY, 1970).

2.3.1.4. Albúmina sérica bovina

Desde el aislamiento de la albúmina cristalina del suero de leche en 1950 y la demostración de que era idéntica a la albúmina del suero sanguíneo para todas las propiedades medidas, excepto en el comportamiento electroforético a pH 4.0, donde ambas se comportan de manera heterogénea, se ha realizado poco trabajo en la proteína aislada de la leche, aunque mucho lo ha sido en la albúmina del suero sanguíneo.

La molécula aparece como una sola cadena peptídica con un grupo -SH libre en la posición 34 del péptido amino terminal y probablemente 17 enlaces disulfuro intramoleculares. El aminoácido N-terminal y C terminal son ácido aspártico y alanina respectivamente, con un peso molecular total de 66,300 D.(PEREZ, 1984).

2.3.2. Protéolisis enzimática

Las enzimas proteolíticas, como su nombre lo indica, tienen una acción específica, siendo su función catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos que mantienen el esqueleto de la molécula proteica.(TAMIME, 1991). Los procesos proteolíticos forman parte de muchas operaciones, siendo tradicionalmente enzimas de origen de plantas y animales; en el oriente por su parte es una tradición antigua el uso de enzimas de origen microbiano en la preparación de varios alimentos. Durante los últimos 50 años la industria de la fermentación ha desarrollado métodos para la producción de enzimas proteolíticas altamente puras a bajo costo principalmente de fuentes microbianas. Dentro de las proteasas

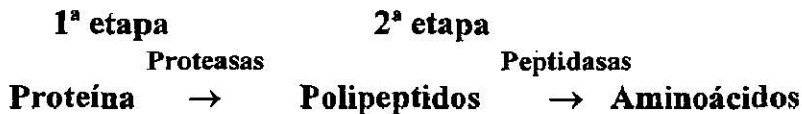
de origen animal, la más importante es la renina, la cual es obtenida de los becerros y es generalmente utilizada para la fabricación de quesos. Aunque la leche puede ser cuagulada por una gran cantidad de proteasas es prácticamente imposible la obtención de un queso palatable y con las características propias de éste.(ROSE, 1980).

2.3.2.1. Degradación de los componentes protéicos

Las enzimas que actúan sobre los enlaces peptídicos se conocen como peptidohidrolasas, las cuales se dividen en dos grupos principales: peptidasas y proteasas. (TAMIME, 1991).

El funcionamiento de las enzimas proteolíticas no se conoce aún en forma completa, pero quizá las enzimas extra celulares degradan inicialmente a la proteína y péptidos mayores en péptidos más pequeños aunque diferentes en tamaño, que son más fácilmente hidrolizados por las enzimas en la pared celular y membrana, reduciendo los compuestos hasta aminoácidos o péptidos muy pequeños que son finalmente hidrolizados en aminoácidos en el interior de la célula.(PEREZ, 1984).

La hidrólisis de las proteínas hasta aminoácidos tiene lugar principalmente en dos etapas:



(TAMIME, 1991).

Existen diferencias importantes en las capacidades proteolíticas entre las especies microbianas y aun entre cepas de las mismas especies, siendo por lo general los lactobacilos más proteolíticos que los estreptococos; la proteólisis de la leche, lleva a la formación de aminoácidos libres y péptidos de muy diversos tamaños.(PEREZ, 1984).

2.3.3. Factores que alteran la actividad proteolítica de los microorganismos adicionados a la leche con fines de industrialización:

- a) Medio de cultivo de propagación.
- b) Edad del cultivo adicionado.
- c) Concentración celular.
- d) Tipo de conservación del cultivo adicionado.(PEREZ, 1984)

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el kilómetro 17 de la carretera Marín-Zuazua en el municipio de Marín, Nuevo León, México.

La duración aproximada fue de 6 meses, iniciando en noviembre de 1994 para concluir en abril de 1995.

El método utilizado es el mismo reportado en el AOAC. (Official Methods of Analysis, 1990); como "Actividad Proteolítica de la Papaína "; el cual se describe a continuación:

3.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

3.1.1. Reactivos

En el cuadro 4 se muestran los reactivos utilizados en dicho método; así como su forma de preparación.

Cuadro 4. Reactivos utilizados para la determinación de la actividad proteolítica.

REACTIVOS	PREPARACIÓN
Fosfato de sodio 0.05 M.	Disolver 0.71 gr. de Na_2HPO_4 anhidro en agua destilada hasta completar 100 ml. (agregar una gota de tolueno como preservativo).
Ácido cítrico 0.05 M.	Disolver 1.05 gr. de ácido cítrico monohidratado con agua destilada y aforar a 100 ml.
Substrato de caseína.	Dispersar 0.05 gr. de caseína de Hamstern en 25 ml. de la solución de fosfato de sodio 0.05 M. Colocar en baño con agua hirviendo por 30 minutos (agitando ocasionalmente). Enfriar a temperatura ambiente. Titular con ácido cítrico 0.05 M. hasta un pH de 6.0 +/- 0.1. (agitar continuamente durante el tiempo de adición del ácido cítrico para prevenir la presipitación de la caseína). Diluir con agua destilada hasta completar 50 ml. (preparar diariamente).
Substrato de Albúmina.	Se prepara de igual manera que el substrato de caseína, con la única diferencia de que se titula con HCl 1 N hasta un pH de 3.
Fosfato de cisteína EDTA (buffer).	Diluir 0.355 gr. de Na_2HPO_4 en 40 ml. de agua destilada. Agregar 0.7 gr. de EDTA y 0.305 gr. de cisteína. Ajustar el pH. (3 o 6 según sea el caso). Aforar con agua destilada hasta 50 ml.
Ácido Tricloroacético (TCA) al 30 %.	Disolver 6 gr. de ácido tricloroacético en agua destilada hasta completar 20 ml.
Solución estándar de la enzima.	Disolver 10 mg. de la enzima (pepsina o papaína) en 10 ml de solución buffer. Diluir posteriormente 1 ml. de ésta solución en 10 ml. de solución buffer. Utilizar después de 30 min.

3.1.2. Curva estándar

Al principio de la realización de la presente investigación, se realizaron pruebas preliminares para elegir las condiciones óptimas para analizar la actividad proteolítica de las bacterias, debido a que se carecía de información acerca del comportamiento de su actividad mediante la utilización de dicho método. Por lo que se realizaron diferentes curvas estándar, utilizando 2 diferentes enzimas comerciales (Pepsina y Papaína) bajo 2 diferentes tipos de sustrato (caseína y albúmina de suero bovino) y utilizando también buffers diferentes (cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones bajo las cuales se realizaron las diferentes curvas estándar.

ENZIMA	SUBSTRATO	SOLUCIONES BUFFER
Pepsina	Caseína	Fosfato de cisteína EDTA a un pH de 6.0 (Buffer 1)
	Albúmina	50 % de fosfato de cisteína EDTA y 50 % de ácido cítrico 0.05 M a un pH de 3 (Buffer 2).
	Albúmina	Fosfato de cisteína EDTA con ácido cítrico a un pH de 3 (Buffer 3). La única diferencia con el buffer 2, es que el ácido cítrico va junto con los componentes de la solución de fosfato de cisteína.
Papaína	Caseína**	Fosfato de cisteína EDTA a un pH de 6.0 (Buffer 1).
	Albúmina	Fosfato de cisteína EDTA a un pH de 6.0 (Buffer 1).

** Se utilizaron 0.5 gr. de Caseína en 50 ml.

Para cada una de las soluciones estándar de las enzimas (Pepsina y Papaína), se etiquetaron 9 tubos de la siguiente manera: S₁(1), S₁(2), S₂(1), S₂(2), S₃(1), S₃(2), S_{1B}, S_{2B} y S_{3B}.

En todos los tubos de ensayo se pipetearon 2.5 ml. del sustrato (caseína y albúmina), de igual manera se pipetearon 0.5 ml., 0.25 ml., y 0 ml. de cada una de las soluciones buffer por separado (buffer 1, buffer 2 y buffer 3) en S₁, S₂ y S₃ respectivamente; cada una con sus respectivas repeticiones (2 repeticiones), así como con sus respectivos blancos (S_{1B}, S_{2B}, S_{3B}). Se colocaron luego todos los tubos en baño maría con agua a una temperatura de 40 °C. durante 10 minutos; después en cada uno de los tubos se pipetearon

0.5 ml., 0.75 ml. y 1 ml. de la solución estándar (Pepsina y Papaína), en S₁, S₂ y S₃ respectivamente (ver el cuadro 6). Se incubaron posteriormente durante 60 minutos a la misma temperatura (40 °C.). Después de este tiempo, a los tubos etiquetados como S_{1B}, S_{2B}, S_{3B} se les agregó 0.5, 0.75 y 1.0 ml. de solución estándar de la enzima; inmediatamente después se agregó a todos los tubos 1.5 ml. de ácido tricloroacético al 30 % agitando cada uno de estos; colocando cada uno de los tubos nuevamente en el baño durante 40 minutos a la misma temperatura, permitiendo que la proteína se cuagulara completamente; luego se filtraron cada uno de los tubos a través de papel whatman número 1 en el mismo papel y finalmente se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 280 nm, (utilizando tubos de cuarzo). comparando cada uno con su respectivo blanco.

Cuadro 6. Esquema general, para la determinación de las condiciones óptimas de análisis de la actividad proteolítica de las bacterias.

SUBSTRATO	BUFFER	pH	ENZIMA	mg/ml de enzima.	# de REPET.
CASEÍNA	BUFFER (1)	3	PEPSINA	0.000	2
				0.050	2
				0.075	2
				0.100	2
		6	PAPAÍNA	0.000	2
				0.050	2
				0.075	2
				0.100	2
ALBÚMINA	BUFFER (1)	6	PAPAÍNA	0.000	2
				0.050	2
				0.075	2
				0.100	2
	BUFFER (2)	3	PEPSINA	0.000	2
				0.050	2
				0.075	2
				0.100	2
	BUFFER (3)	3	PEPSINA	0.000	2
				0.050	2
				0.075	2
				0.100	2

3.1.3. Actividad Proteolítica de las bacterias

La Actividad Proteolítica de las bacterias, fué determinada utilizando como estándar la pepsina, como substrato albúmina de suero bovino y como buffers, 50 % de fosfato de cisteína y 50 % de ácido cítrico 0.05 M. (buffer 2) y fosfato de cisteína con ácido cítrico (buffer 3), debido a que, bajo éstas condiciones se obtuvieron valores más altos de actividad, así, como una mejor correlación (dichos resultados son mostrados a continuación en la sección de resultados). Se siguió la misma metodología que para los estándares, con las siguientes variaciones: se utilizaron 0.9 ml. de solución buffer (buffer 3), ésto debido a que la cantidad de ml. de las bacterias fué de 0.1 ml., cada uno con sus respectivas repeticiones, así como con sus respectivos blancos (el blanco utilizado para las bacterias fue medio de cultivo líquido pero sin inóculo de bacterias).

Las bacterias utilizadas en el experimento fueron: *Lactobacillus bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA), *L. plantarum* (LP), *Streptococcus termophilus* (ST), *S. láctis* (SL) y *S. crémoris* (SC), las cuales se inocularon en medio de cultivo agar láctico o caldo lactosado (cuadro 7) e incubadas bajo sus condiciones óptimas de temperatura. (35 °C, exepcto el *Streptococcus termóphilus* que fue incubado a 45 °C) durante 24 horas.

Cuadro 7. Composición del agar láctico o caldo lactosado.

INGREDIENTES	CANTIDAD (gramos por litro)
Caldo de soya tripto caseína	20.0
Extracto de levaduras	5.0
Lactosa	5.0
Glucosa	5.0
Sacarosa	5.0
Cloruro de sodio	4.0
Acetato de sodio	1.5
Ácido ascórbico	0.5

Para la determinación de las condiciones óptimas, en las que se obtiene la mejor actividad proteolítica, se utilizaron diferentes condiciones de pH y de temperatura así como bacterias centrifugadas y no centrifugadas, para el caso de las bacterias centrifugadas se utilizaron 5000 revoluciones por minuto por un tiempo de 5 minutos.

Para la determinación del pH óptimo se prepararon las soluciones buffer a diferentes pHs (2, 3, 3.5, 3.895, 5, 6.5, 7.5, para el "buffer2" y 3, 4, 5, 6, 7, para el "buffer 3") los cuáles se utilizaron en cada una de las bacterias manteniendo la temperatura de incubación constante (40 °C); una vez obtenido el pH óptimo se obtuvo la temperatura óptima aplicando la técnica anteriormente descrita variando solamente las temperaturas para cada una de las bacterias (25, 30, 35, 37, 40, 45 y 50 °C, para ambos buffer) y manteniendo constante el pH óptimo obtenido y finalmente teniendo pH y temperatura óptimas para cada una de las bacterias, se utilizaron éstas para la determinación de la actividad proteolítica en base al tiempo, midiendo la densidad óptica a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos).

3.1.4. Cálculos

Para calcular la actividad proteolítica se utilizó la siguiente fórmula:

$$AP = \left(\frac{1}{S}\right) \times DO \times \left(\frac{1}{0.1}\right)$$

Donde:

AP: Actividad proteolítica equivalente a mg de pepsina por ml.

S: Pendiente.

DO: Densidad óptica a 280 nm.

0.1: ml.de muestra.

3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Para la determinación de la actividad proteolítica en base a mg de proteína por ml. de bacterias por minuto; fue necesario la determinación de proteína en mg por ml. para cada una de las bacterias, para lo cuál se utilizó el método Lowry (LOWRY, 1951)., que consiste en lo siguiente: .

3.2.1. Reactivos

En el cuadro 8 se muestran los reactivos utilizados para la determinación de proteína de las bacterias por el método de Lowry.

Cuadro 8. Reactivos utilizados para la determinación de proteína.

REACTIVOS	PREPARACIÓN
Solución de .1 N de NaOH.	Se pesaron 4.0 gr. de NaOH y se aforó a un litro con agua destilada.
REACTIVO A (solución de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH .1 N).	Disolver 2 gr. de Na_2CO_3 en 100 ml de solución de 0.1 N de NaOH.
Tartrato de potasio o de sodio al 1 %.	Disolver 1 gr. de Tartrato de potasio o de sodio en 100 ml. de agua desionizada.
REACTIVO B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al .5 % en 1% de Tartrato de potasio o de sodio).	Disolver 0.5 gr. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de Tartrato de potasio o de sodio.
REACTIVO C.	Mezclar 50 ml. del REACTIVO A con un ml. del REACTIVO B. (Déscartelo después de un día).
REACTIVO D.	Mezcle 2.5 ml. de solución de REACTIVO DE FOLIN 2 N con 2.5 ml. de agua desionizada.
Solución estándar.	Disolver 0.1 gr. de albúmina de suero bovino en 25 ml. de NaOH 0.1 N. (la concentración final será de 400 microgramos por ml.).

3.2.2. Curva estándar

Cuadro 9. Curva estándar de proteína.

μ /ml de proteína	ml. de solución estándar	ml. de muestra	ml. de agua destilada.	ml. de Reactivo C *	ml. de Reactivo E **	# de repeticiones.
0	0.0	0	0.60	3	0.30	2
20	0.05	0	0.55	3	0.30	2
40	0.10	0	0.50	3	0.30	2
80	0.20	0	0.40	3	0.30	2
120	0.30	0	0.30	3	0.30	2
160	0.40	0	0.20	3	0.30	2
200	0.50	0	0.10	3	0.30	2
240	0.60	0	0.0	3	0.30	2
	0.0	0.60	0.0	3	0.30	3

* Después de agregar el reactivo C se espera 10 min.

** Una vez pasados los 10 minutos, se agrega el reactivo E y se lee la absorbancia a 660 nm. después de 30 min.

3.2.3. Proteína de las bacterias

En un tubo de ensaye se transfirió una alícuota de 0.6 ml de cada una de las bacterias, se agregó posteriormente 3 ml. de Reactivo C, después de 10 minutos se agregó el Reactivo E y una vez pasados 30 min. se efectuó la lectura de absorbancia a 660 nm. Lo anterior se realizó por 3 repeticiones para cada una de las bacterias.

3.2.4. Cálculos

$$\mu/\text{ml. de proteína} = \left(\frac{1}{Sp} \right) \times DOp \times \left(\frac{1}{0.6} \right)$$

$$\text{mg/ml. de proteína} = \left[\left(\frac{1}{Sp} \right) \times DOp \times \left(\frac{1}{0.6} \right) \right] \div 1000$$

Donde:

Sp: Pendiente (de la curva estándar de proteína).

DOp: Densidad óptica a 640 nm. (de proteína).

0.6: Volúmen total.

$$APR = \left(\frac{AP}{mg / ml. \text{ proteína}} \right)$$

Dónde:

APR: Actividad proteolítica real.

AP: Actividad proteolítica equivalente a mg de pepsina.

$$APR/min. = \left(\frac{APR}{60} \right)$$

Dónde:

APR/min.: Actividad proteolítica real por minuto.

APR: Actividad proteolítica real.

$$\# \text{ de células / ml.} = [(DO_c) \times (1 \times 10^9)] \div 0.1$$

Dónde:

DO_c: Densidad óptica (a 686 nm.).

0.1: Debido a que 0.1 de DO a 686 nm. equivale a 1×10^9 células / ml.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza, utilizando el paquete de computación "LSMLMW", con un arreglo factorial, con distribución completamente azar de los tratamientos; y cuyo modelo se muestra a continuación:

3.3.1. Actividad proteolítica a diferente pH

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + pH_j + B_i * pH_j + e_{ijk}$$

Donde:

μ = Media general.

B_i = i-ésima bacteria.

pH_j = j-ésimo pH.

$B_i * pH_j$ = Interacción de la i-ésima bacteria con el j-ésimo pH.

e_{ijk} = k-ésimo error en el j-ésimo pH en la i-ésima bacteria.

3.3.2. Actividad proteolítica a diferente temperatura

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + B_i * T_j + e_{ijk}$$

Donde:

μ = Media general.

B_i = i-ésima bacteria.

T_j = j-ésima temperatura.

$B_i * T_j$ = Interacción de la i-ésima bacteria con el j-ésima temperatura.

e_{ijk} = k-ésimo error en el j-ésima temperatura en la i-ésima bacteria.

3.3.3. Actividad proteolítica a diferente tiempo

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + t_j + B_i * t_j + e_{ijk}$$

Donde:

μ = Media general.

B_i = i-ésima bacteria.

t_j = j-ésimo tiempo de incubación.

$B_i * t_j$ = Interacción de la i-ésima bacteria con el j-ésimo tiempo de incubación.

e_{ijk} = k-ésimo error en el j-ésimo tiempo de incubación en la i-ésima bacteria.

IV. RESULTADOS

4.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

4.1.1. Curva estándar

En el cuadro 10 se muestran los promedios de densidad óptica a 280 nm. obtenidos de 2 repeticiones, utilizando como solución estándar, diferentes concentraciones de pepsina (0.05, 0.075 y 0.1 mg. por ml.), bajo 2 diferentes tipos de substrato (albúmina de suero bovino y caseína), utilizando los diferentes tipos de buffers (buffer 1, buffer 2 y buffer 3).

Cuadro 10. Densidad óptica a 280 nm. de la pepsina bajo las diferentes condiciones.

Mg. DE PEPSINA	DENSIDAD ÓPTICA A 280 nm.		
	PEPSINA-CASEÍNA (BUFFER 1)	PEPSINA-ALBÚMINA (BUFFER 2)	PEPSINA-ALBÚMINA (BUFFER 3)
0	0	0	0
0.050	0.03525	0.0500	0.1235
0.075	0.03715	0.0575	0.1855
0.100	0.04600	0.0620	0.2150

Mediante un análisis de regresión lineal, para cada una de las condiciones anteriores utilizando como estándar diferentes concentraciones de pepsina (cuadro 1), se obtuvieron como mejores condiciones para desarrollar una buena actividad proteolítica el utilizar como substrato albúmina sérica bovina con buffer 3, ya que se obtuvo un máximo coeficiente de determinación ($R^2 = 0.8621$), obteniéndose, además valores de densidad óptica relativamente más altos; mientras que la R^2 utilizando como substrato albúmina pero con el buffer 2 fué de 0.3209 y la R^2 utilizando como substrato caseína con buffer 1 fue de 0.22060. El hecho de haber obtenido valores de correlación demasiado bajos nos indica que no estamos dentro las cantidades óptimas de la enzima (pepsina), por lo que se recomienda realizar la curva estándar con un rango mayor de mg. de la enzima en cuestión.

En las figuras 1, 2, 3, se muestran las curvas estándar de la pepsina, bajo las diferentes condiciones de substrato y buffer utilizado (pepsina-caseína con buffer 1,

pepsina-albúmina con buffer 2 y pepsina-albúmina con buffer 3). Donde, R1 y R2 son las repeticiones

Fig. 1. Curva estándar de la pepsina utilizando como sustrato caseína y el buffer 1.

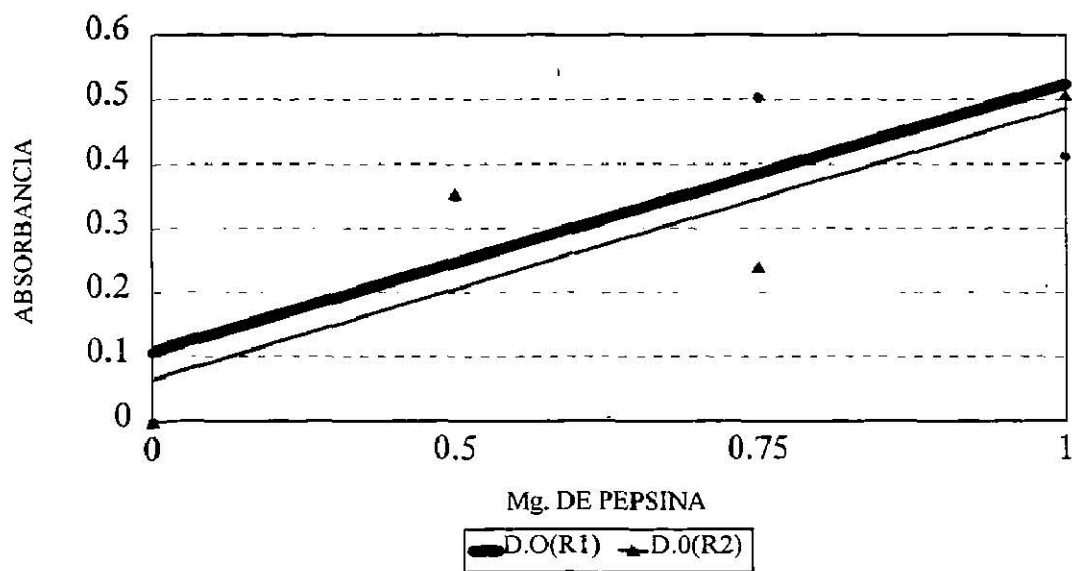


Fig. 2. Curva estándar de la pepsina utilizando como sustrato albúmina con el buffer 2.

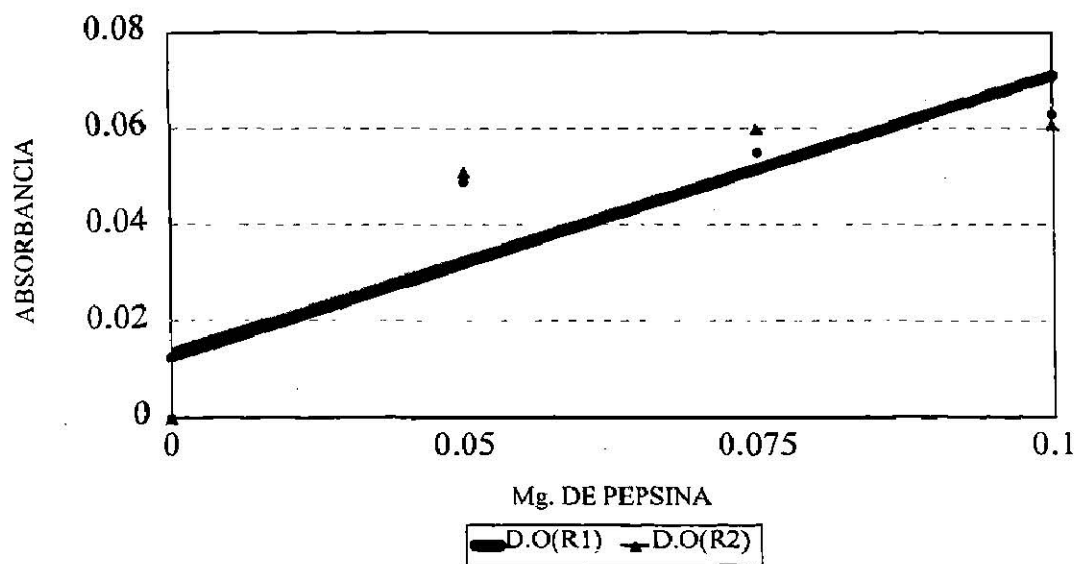
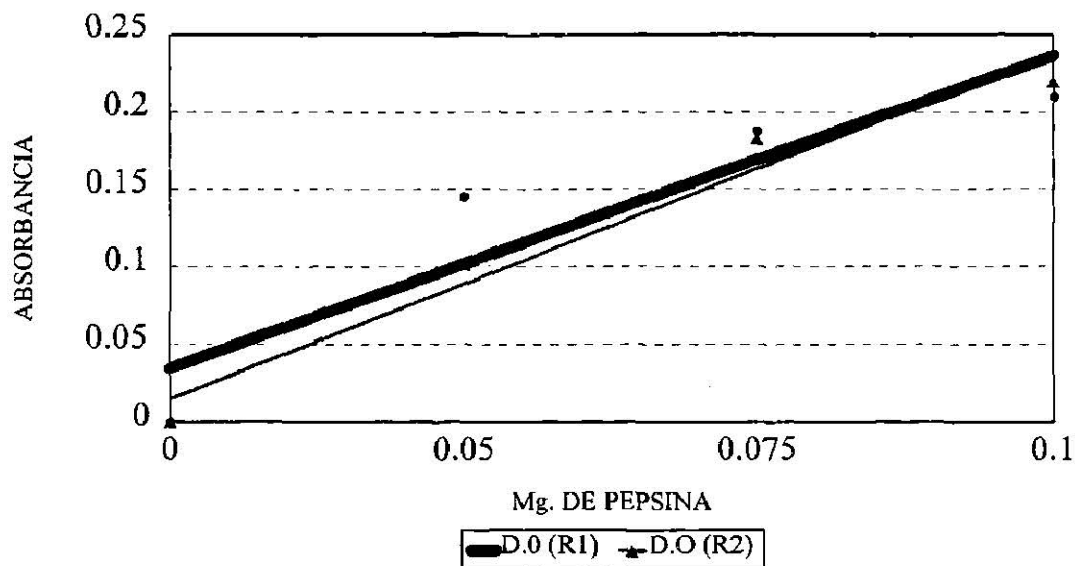


Fig. 3. Curva estándar de la pepsina utilizando como substrato albúmina y el buffer 3.



En el cuadro 11. Se muestran los promedios (de dos repeticiones) de los resultados obtenidos de densidad óptica a 280nm. utilizando como estándar diferentes concentraciones de papaína y 2 diferentes tipos de substrato (albúmina y caseína); (en ésta se utilizó solamente el buffer 1 debido a, que de acuerdo a la técnica es el óptimo para la papaína).

Cuadro 11. Densidad óptica de la papaína bajo las diferentes condiciones.

Mg. DE PAPAÍNA	DENSIDAD ÓPTICA A 280 nm.	
	PAPAÍNA-CASEÍNA**	PAPAÍNA-ALBUMINA
0	0	0
0.050	0.3730	0.289
0.075	0.4315	0.2255
0.100	0.6250	0.197

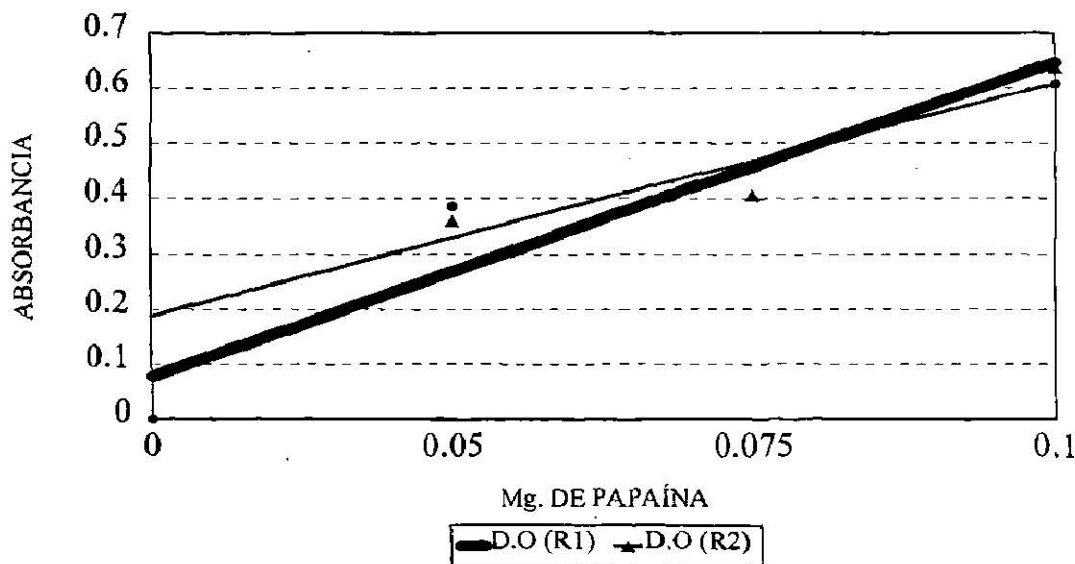
** En ésta se utilizarón .5ml de caseína en 50 ml.

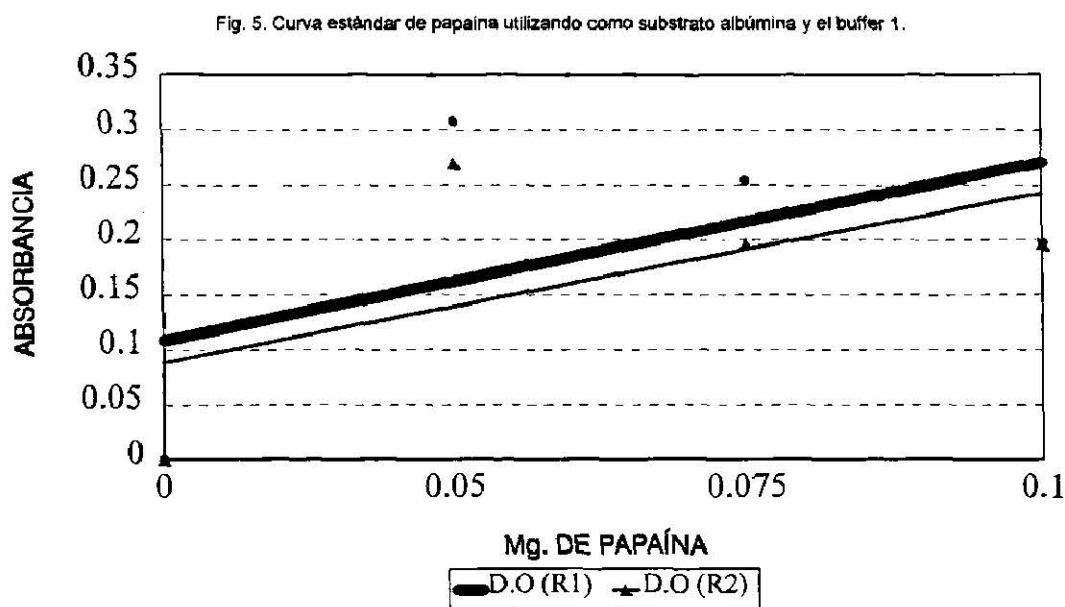
Al igual que los resultados anteriores (cuadro 10), los resultados mostrados en el cuadro 11, fueron también analizados mediante un análisis de regresión lineal, mediante el cual se obtuvo como mejor substrato para desarrollar una buena actividad proteolítica la

caseína con buffer 1, ya que se obtuvo una correlación mayor, con una R^2 de 0.8873; mientras que utilizando como substrato albúmina sérica con buffer 1 se obtuvo una R^2 de 0.7543 (con una $R = -0.8685$). El hecho de haber obtenido valores mayores de densidad óptica con caseína como substrato que utilizando albúmina, puede deberse a que se utilizó mayor cantidad de caseína (0.5ml. en 50 ml. de solución buffer), que albúmina (.05 ml. en 50 ml. de solución buffer) y la baja correlación para la papaína con albúmina, nos indica también que, para la elaboración de la curva se debe tomar un rango mayor de mg. de enzima (papaína), de preferencia valores menores, debido a que como se observa el valor negativo de la R ($R = -0.8685$) se debe quizás a que se encuentra en la etapa de decrecimiento de la actividad.

En las figuras 4 y 5 se muestran las curvas estándar de la papaína, bajo las diferentes condiciones de substrato y buffer utilizado (papapína-caseína con buffer 1 y papaína- albúmina con buffer 1).

Fig. 4. Curva estándar de papaína utilizando como substrato caseína y el buffer 1.





Los resultados obtenidos del análisis de regresión lineal para cada una de las diferentes condiciones de las soluciones estándar (pepsina y papaína) indicaron que la actividad proteolítica está directamente influenciada por el tipo de sustrato y buffer utilizado, presentando los valores más altos la papaína con sustrato de caseína utilizando el buffer 1 a pH de 6.0, seguida por la pepsina con sustrato de albúmina y buffer 3 a pH 3, mientras que la papaína con sustrato de albúmina y buffer 1 a pH 6.0 presentó los valores más bajos; dichos resultados nos indican también que dichas enzimas, a pesar de ser ambas proteolíticas son altamente específicas.

A continuación se muestra un resumen de la densidad óptica a 280 nm, de cada una de las soluciones estándar (pepsina y papaína), bajo las diferentes condiciones de sustrato y tipo de buffer utilizado (cuadro 12).

Cuadro 12. Resumen general, de las diferentes condiciones de análisis para la determinación de la actividad proteolítica de las bacterias.

SUBSTRATO	BUFFER	pH	ENZIMA	mg/ml DE ENZIMA	D.O (PROM)
CASEÍNA	BUFFER (1)	3	PEPSINA	0.000	0
				0.050	0.0352
				0.075	0.0371
				0.100	0.0460
		6	PAPAÍNA	0.000	0
				0.500	0.3730
				0.750	0.4315
				1.000	0.6250
ALBÚMINA	BUFFER (1)	6	PAPAÍNA	0.000	0
				0.050	0.2890
				0.075	0.2255
				0.100	0.1970
	BUFFER (2)	3	PEPSINA	0.000	0
				0.050	0.0500
				0.075	0.0575
				0.100	0.0620
	BUFFER (3)	3	PEPSINA	0.000	0
				0.050	0.1235
				0.075	0.1855
				0.100	0.2150

Aunque se obtuvieron mejores resultados utilizando papaina con sustrato de caseína, para evaluar la actividad proteolítica de cada una de las bacterias se optó por utilizar como sustrato albúmina sérica bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación en las bacterias, utilizando como buffer, 50 % de fosfato de cisteína EDTA y 50 % de ácido cítrico 0.05M. (buffer 2) y fosfato de cisteína EDTA con ácido cítrico (buffer 3), reportando la actividad proteolítica como equivalente a mg. de pepsina (AP), ésto debido a que la diferencia entre éstas no fue significativa. Siendo aún más confiable utilizar como estándar pepsina y como sustrato albúmina debido a que se utilizaron las mismas concentraciones de sustrato (1 mg/ml.).

4.1.2. Actividad proteolítica de las bacterias, bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación.

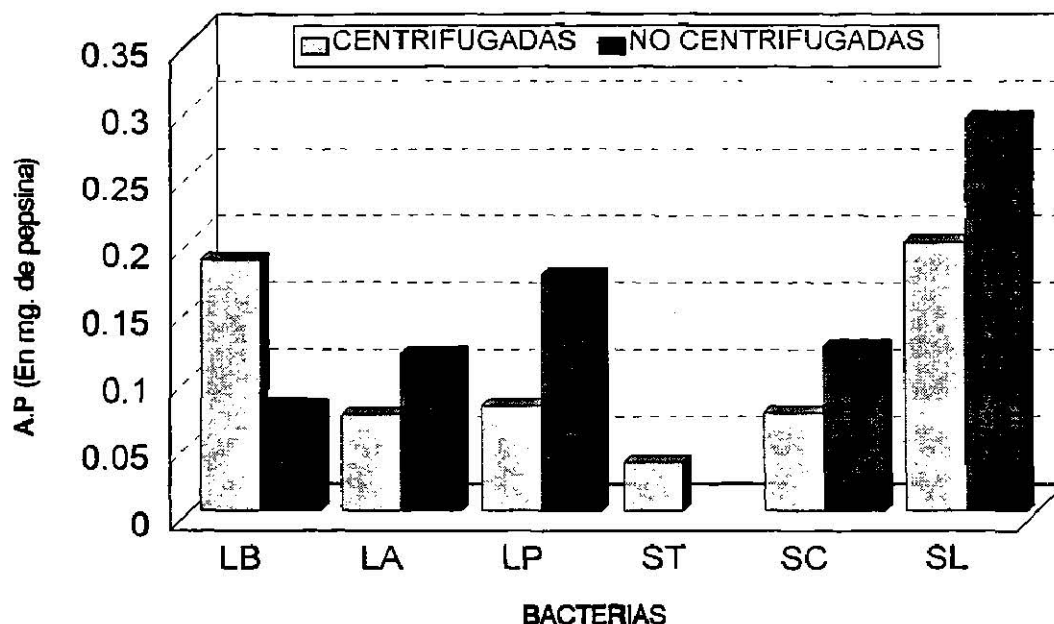
Los resultados obtenidos, de actividad proteolítica de cada una de las bacterias, bajo las diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación; fueron analizados mediante un análisis de varianza, utilizando el paquete de computación "LSMLMW", con un diseño completamente al azar y un arreglo factorial, cuyo modelo estadístico se explica en la sección de materiales y métodos.

a) Efecto de la centrifugación de las bacterias sobre la actividad proteolítica

El análisis estadístico, de los resultados obtenidos del comportamiento de la actividad proteolítica de las bacterias centrifugadas y no centrifugadas, utilizando como buffer una solución de 50 % de fosfato de cisteína y 50 % de ac. cítrico 0.05 M (buffer 2 a pH 3); reveló que no existía diferencia significativa entre bacterias centrifugadas y no centrifugadas ($p > 0.05$), por lo que en los siguientes análisis se optó por utilizar solamente bacterias no centrifugadas.

En la fig. 6 se muestra el comportamiento de la actividad proteolítica de las bacterias centrifugadas y no centrifugadas utilizando como substrato albúmina sérica bovina y como buffer 50 % de fosfato de cisteína y 50 % de ácido cítrico 0.05 M.

Fig. 6. Comportamiento de la Actividad Proteolítica de las bacterias tanto centrifugadas como no centrifugadas utilizando el buffer 2.



Lactobacillus bulgáricus (LB), *L. acidóphilus* (LA), *L. plantarum* (LP), *Streptococcus termóphilus* (ST), *S. cremoris* (SC) y *S. láctis* (SL). Nota: en las siguientes figuras se utilizará la misma terminología para cada una de las bacterias.

Aunque mediante el análisis estadístico, no se observó diferencia significativa entre las bacterias centrifugadas y no centrifugadas, en la figura anterior se logra observar que las bacterias no centrifugadas desarrollaron una mayor actividad proteolítica.

b) Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las bacterias

Mediante el análisis de varianza, de los resultados obtenidos de actividad proteolítica de cada una de las bacterias, utilizando como substrato albúmina de suero bovino, bajo diferente pH (2, 3, 3.5, 3.895, 5, 6.5 y 7.5), como buffer una solución de 50 % fosfato de cisteína y 50 % de ácido cítrico 0.05 M (buffer 2), se obtuvo, que existe una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de cada una de las bacterias

entre si, con un nivel de significancia < 0.001 , así como también existe una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias bajo los diferentes pH's con un nivel de significancia de 0.0060; siendo el mejor pH para todas las bacterias el 5, así como la bacteria que presentó la mejor actividad fue el *Lactobacillus acidophilus*. No existiendo diferencia significativa entre la actividad proteolítica de cada una de las bacterias bajo los diferentes pH's, ya que el nivel de significancia fue de 0.1877. Esto significa que no hubo interacción entre las bacterias y los pH's.

Aunque, mediante el análisis estadístico se obtuvo que no existía diferencia significativa entre la actividad proteolítica de cada una de las bacterias, bajo los diferentes pH's, en el cuadro 13 se muestra el pH, en el cual se obtuvo la mejor actividad proteolítica, al utilizar como sustrato albúmina y el buffer 2.

Cuadro 13. Actividad proteolítica a pH óptimo de cada una de las bacterias (buffer 2).

BACTERIAS	MEJOR pH	A. PROTEOLÍTICA
Lactobacillus bulgaricus	6.5	0.2574
Lactobacillus acidophilus	5.0	0.3926
Lactobacillus plantarum	5.0	0.1911
Streptococcus termóphilus	5.0	0.1317
Streptococcus cremoris	5.0	0.2268

Mientras que, utilizando el buffer 3 se obtuvo, que, existía diferencia significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias entre sí, con un nivel de significancia de 0.0253; no obteniéndose diferencia significativa entre la actividad proteolítica las bacterias a los diferentes pH's, esto con un nivel de significancia de 0.6660; siendo los mejores pH's el 3 y el 5 para todas las bacterias y la bacteria que presentó la mejor actividad proteolítica fue también el *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, cada una de las bacterias no mostró diferencia significativa en su actividad proteolítica bajo los diferentes pH's, ya que

su nivel de significancia fue de 0.3544; aún así se muestran a continuación los pH's, bajo los cuales se obtuvo la mejor actividad proteolítica para cada una de las bacterias (cuadro 14).

Cuadro 14. Actividad proteolítica a pH óptimo de cada una de las bacterias (buffer 3).

BACTERIAS	MEJOR pH	A. PROTEOLÍTICA
Lactobacillus bulgaricus	5.0	0.2841
Lactobacillus acidophilus	3.0	0.5765
Lactobacillus plantarum	7.0	0.2896
Streptococcus termophilus	5.0	0.5327

En las figuras 7 y 8 se muestra el comportamiento de la actividad proteolítica para cada una de las bacterias, utilizando como sustrato albúmina de suero bovino y como buffers, una solución de 50 % fosfato de cisteína EDTA y 50 % ácido cítrico (buffer 2) y fosfato de cisteína EDTA con ácido cítrico (buffer 3).

Fig. 7. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente pH utilizando el buffer 1.

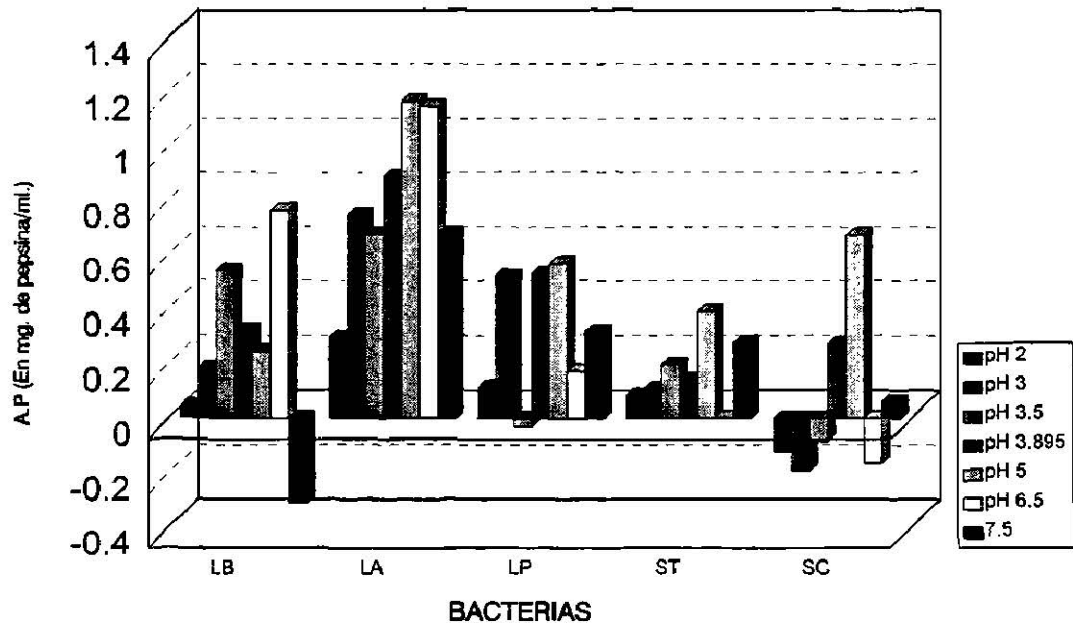
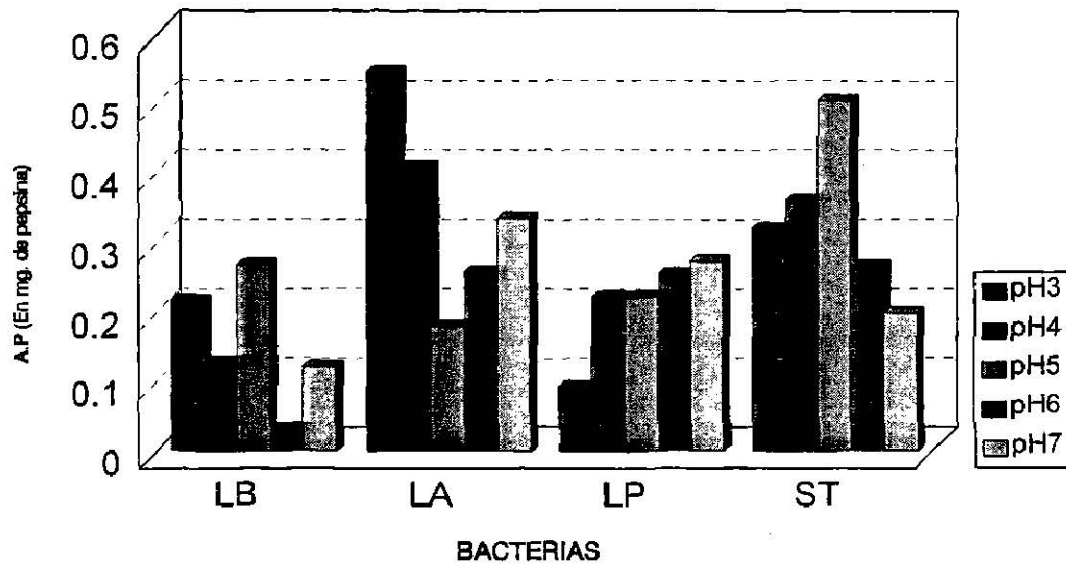


Fig. 8. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente pH utilizando el buffer 3.



c) Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad proteolítica de las bacterias

Mediante el análisis de varianza, de los resultados obtenidos de la actividad proteolítica a diferente temperatura (25, 30, 35, 37, 40, 45 y 50 °C), se obtuvo que, utilizando el buffer 2 a un pH 5 e incubando a diferentes temperaturas; no existía diferencia significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias entre sí, esto con un nivel de significancia del 0.999. Siendo el *Streptococcus termóphilus* la bacteria que presentó la mayor actividad proteolítica. (se utilizó el pH 5 para todas las bacterias, debido a que resultó ser el mejor con el buuffer 2). A continuación se muestran los mejores resultados obtenidos de actividad proteolítica para cada una de las bacterias bajo éstas condiciones (cuadro 15).

Cuadro 15. Actividad proteolítica a temperatura óptima, para cada una de las bacterias, utilizando el buffer 2.

BACTERIAS	MEJOR T°	A. PROTEOLÍTICA
Lactobacillus bulgaricus	40	0.1492
Lactobacillus acidophilus	25	0.2216
Lactobacillus plantarum	25	0.1710
Streptococcus termóphilus	37	0.2949

Sin embargo, cuando se utilizó el buffer 3 a pH 5 (pH bajo el cual se obtuvo la mejor actividad proteolítica, en cada una de las bacterias), se obtuvo que existía una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de cada una de las bacterias entre sí, con un nivel de significancia de 0.0006; presentando la mayor actividad proteolítica el *S. termóphilus*; existiendo también una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias a las diferentes temperaturas, con un nivel de

significancia <0.0001 , siendo la mejor temperatura para todas las bacterias $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. No existiendo diferencia significativa entre la actividad proteolítica de cada una de las bacterias a las diferentes temperaturas, con un nivel de significancia de 0.1903 (No hubo efecto de interacción). A continuación se muestra la temperatura, bajo la cual se obtuvo la mejor actividad proteolítica para cada una de las bacterias, bajo éstas condiciones (cuadro 16).

Cuadro 16. Actividad proteolítica a temperatura óptima, para cada una de las bacterias, utilizando el buffer 3.

BACTERIAS	MEJOR T°	A. PROTEOLÍTICA
Lactobacillus bulgaricus	37	0.4398
Lactobacillus acidophilus	35	0.4371
Lactobacillus plantarum	35	0.5058
Streptococcus termóphilus	37	0.5546

Fig. 9. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente temperatura utilizando el buffer 2.

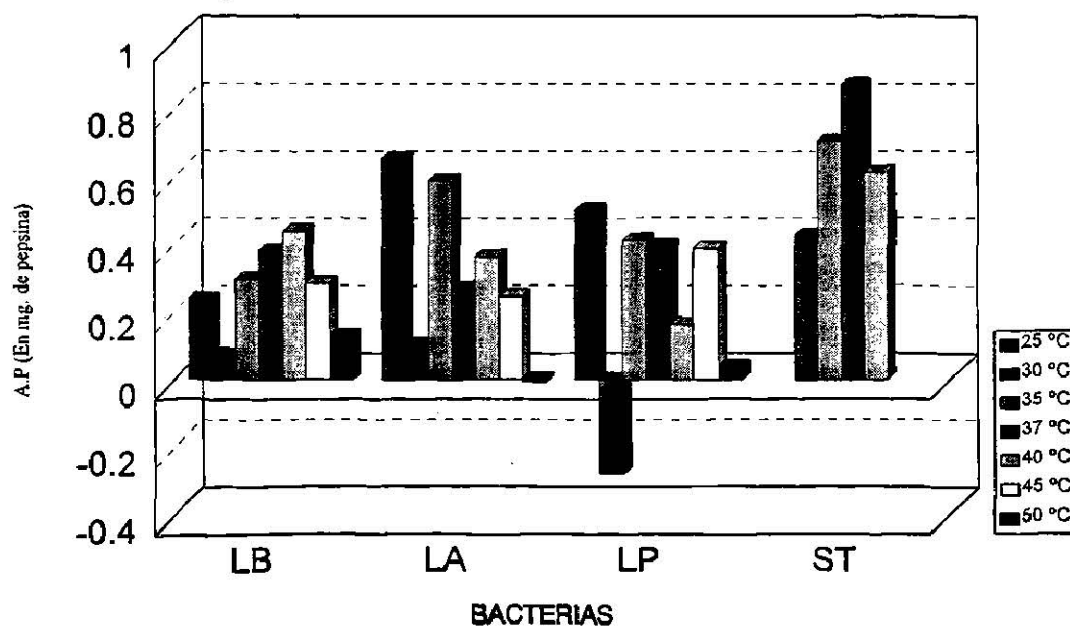
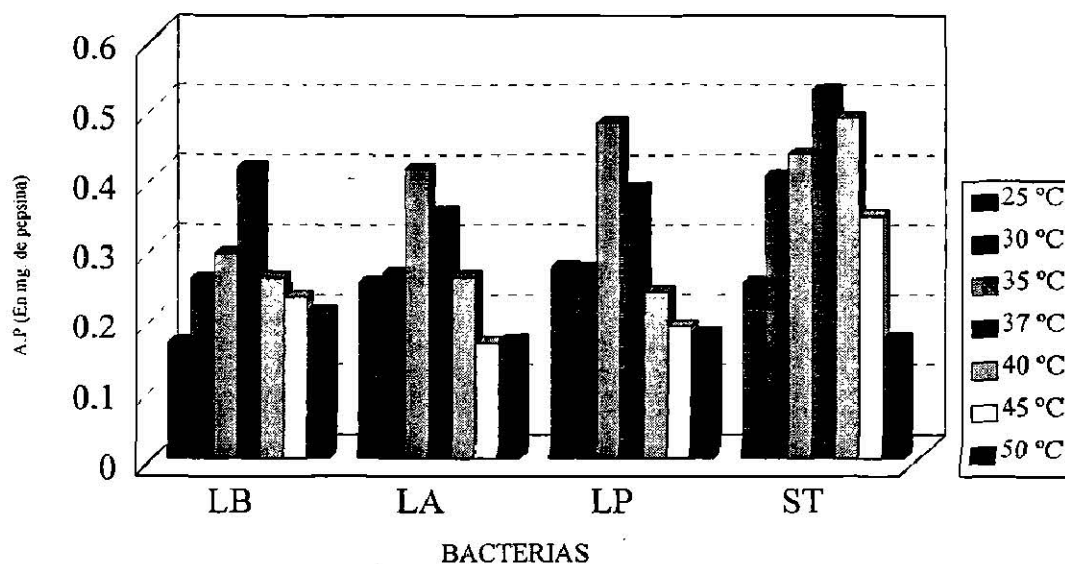


Fig. 10. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente temperatura utilizando el buffer 3.



d) Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad proteolítica de las bacterias

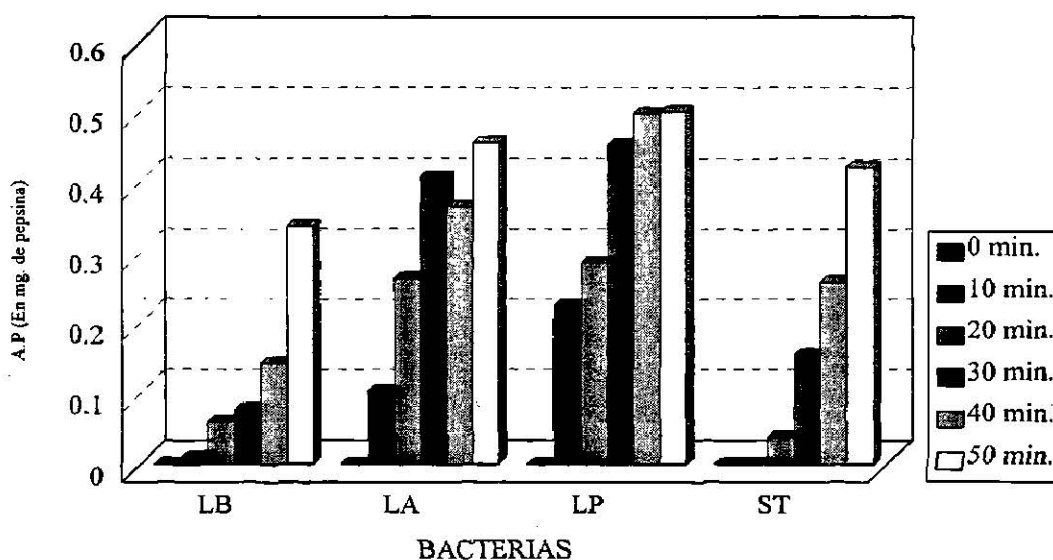
Para la realización de éste análisis (actividad proteolítica a diferente tiempo de incubación) se utilizaron las condiciones óptimas para cada bacteria, las cuáles resultaron de los análisis anteriores; utilizando como substrato albúmina y el buffer 3. Y mediante el análisis de varianza se obtuvo, que bajo éstas condiciones, existía una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias entre sí, con un nivel de significancia < 0.0001 ; presentando la mejor actividad proteolítica el *L. plantarum*; así como también se obtuvo que existía una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de las bacterias a los diferentes tiempos de incubación, con un nivel de significancia < 0.0001 , siendo el mejor tiempo para todas las bacterias 50 minutos a pH y temperatura óptimos, con un nivel de significancia < 0.0001 . Se obtuvo también que existía una diferencia altamente significativa entre la actividad proteolítica de cada una de

las bacterias bajo los diferentes tiempos de incubación (cuadro 17) con un nivel de significancia < 0.0001 .

Cuadro 17. Actividad proteolítica de cada una de las bacterias al tiempo óptimo, utilizando el buffer 3.

BACTERIAS	MEJOR TIEMPO	A. PROTEOLÍTICA
Lactobacillus bulgaricus (pH5, T°37)	50	0.08190
Lactobacillus acidophilus (pH3, T°35)	50	0.4808
Lactobacillus plantarum (pH5, T°35)	50	0.5273
Streptococcus termóphilus(pH5, T°37)	50	0.4453

Fig. 11. Comportamiento de la Actividad Proteolítica a diferente tiempo de incubación utilizando el buffer 3.



En base a la fig. 11 podemos decir, que bajo las condiciones utilizadas de análisis, la actividad proteolítica de las bacterias es directamente proporcional al tiempo de incubación.

Se muestra a continuación un resumen del análisis de varianza, de la actividad proteolítica de las bacterias; que incluye la media, desviación estándar, coeficiente de

variación (C.V), la R y R^2 , para cada una de las variables analizadas, por el paquete de computación "LSMLMW"; bajo las diferentes condiciones, utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial y cuyo modelo estadístico se muestra en la sección de materiales y métodos. (cuadro 18).

Cuadro 18. Resumen del análisis de varianza de cada una de las variables analizadas.

Variables	Media	Desv. est.	C.V	R	R^2
pH (Buffer 2)	0.1104	0.0919	83.23	0.876	0.767
pH(Buffer 3)	0.2755	0.1578	57.28	0.765	0.585
Temperatura(Buffer 2)	0.1126	0.0771	68.47	0.838	0.702
Temperatura(Buffer 3)	0.3144	0.0735	23.38	0.906	0.821
Tiempo (Buffer 3)	0.2224	0.0381	17.16	0.990	0.980

El coeficiente de variación (CV) demasiado elevado, que se observa en las diferentes condiciones, puede que se deba, principalmente a que las condiciones óptimas para la actividad proteolítica no han sido definidas aún, por ejemplo el tipo de buffer utilizado, pH's utilizados y temperatura.

Por otra parte, se pudo observar en el transcurso de la investigación que el coeficiente de determinación (R^2) se fue incrementando conforme se seleccionaban las condiciones óptimas (temperatura, pH y sustrato), tanto para los estándares (análisis de regresión lineal), como para cada una de las bacterias (análisis de varianza).

En general, en los resultados mostrados en el cuadro 18 se observa, que a medida que se optimizaban las condiciones, para desarrollar un máximo de actividad de las bacterias, se lograban resultados con menor margen de error, siendo éstos cada vez más confiables.

4.1.3. Actividad proteolítica de las bacterias bajo condiciones óptimas

En el cuadro 19 se muestran los promedios de 3 repeticiones de los resultados obtenidos, de actividad proteolítica, utilizando las condiciones óptimas de pH, temperatura

y tiempo de incubación de cada una de las bacterias, como substrato albúmina de suero bovino y como buffer fosfato de cisteína con ácido cítrico (buffer 3).

Cuadro 19. Actividad proteolítica de las bacterias, bajo condiciones óptimas.

BACTERIAS	ACTIV. PROTOLÍTIC. (mg. de pepsina)
LB (pH 5, T° 37)	0.3225
LA (pH 3, T° 35)	0.4116
LP (pH 5, T° 35)	0.4520
ST (pH 5, T° 37)	0.6249
SC (pH 5, T° 40)	0.2294
SL (pH 5, T° 40)	0.2387

4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS BACTERIAS

4.2.1. Curva estándar

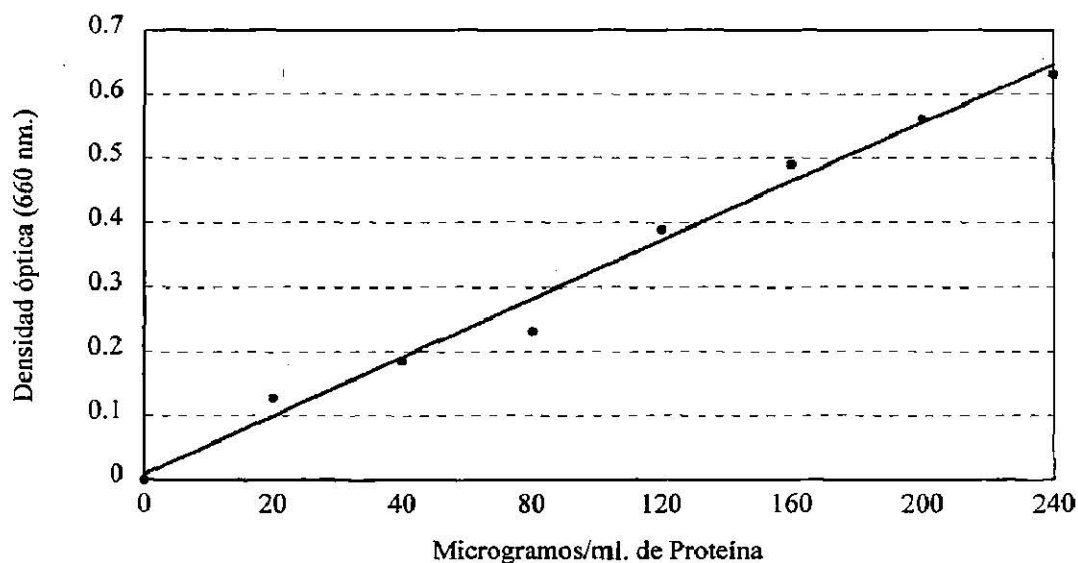
En el cuadro 20 se muestran los resultados obtenidos de densidad óptica a 660 nm., utilizando como estándar diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200 y 240 µg/ml. de proteína). Los cuales fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal, obteniéndose una $R^2 = 0.9768$.

Cuadro 20. Densidad óptica a 660 nm. utilizando como estándar diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino.

µg/ml.	D.O (a 660 nm.)
0	0
20	0.128
40	0.186
80	0.232
120	0.390
160	0.490
200	0.562
240	0.632

En la figura 12 se muestra la curva estándar para la densidad óptica a 660 nm. utilizando como solución estándar de proteína albúmina de suero bovino.

Fig. 12. Curva estándar de proteína.



En el cuadro 21 se muestran los resultados obtenidos de actividad proteolítica real (APR) de cada una de las bacterias, tomando en cuenta la actividad proteolítica equivalente a miligramos de pepsina (AP), bajo las condiciones óptimas obtenidas anteriormente, así como la cantidad de proteína por ml. de bacterias. En base a las condiciones de análisis (actividad proteolítica en base al tiempo), se obtuvo que el incremento de la actividad proteolítica de las bacterias, es proporcional al tiempo de incubación; por lo que se optó por reportar la actividad proteolítica real en base al tiempo como APR/min. (actividad proteolítica en mg. de proteína por ml. por minuto).

Cuadro 21. Actividad proteolítica real de las bacterias (APR).

Bacterias	mg/ml de proteína.	AP	APR	APR/min.	Núm. de células/ml.
LB	0.26560203	0.3225	1.2142	0.0202	0.665×10^{10}
LA	0.1620879	0.4116	2.5407	0.0423	0.974×10^{10}
LP	0.3324769	0.4520	1.3598	0.0226	1.126×10^{10}
ST	0.2516514	0.6249	2.4837	0.0413	1.006×10^{10}
SC	0.2713116	0.2294	0.8455	0.0140	0.758×10^{10}
SL	0.1467966	0.2387	1.6271	0.0271	0.801×10^{10}

Donde:

APR = Actividad proteolítica real, en mg./ml. de proteína.

AP = Actividad proteolítica equivalente a mg. de pepsina.

De los resultados mostrados anteriormente, podemos observar, que en el transcurso de la presente investigación, de las bacterias utilizadas, los *Lactobacillus* fueron los que aparentemente presentaron una mayor actividad proteolítica (equivalente a mg de pepsina); pero finalmente, una vez determinada la cantidad de proteína por ml. de bacteria y el haber utilizado dichos resultados para determinar la actividad proteolítica real (APR) de cada una de las bacterias, bajo sus condiciones óptimas, resultó que no existía tal diferencia, presentando ambas (*Lactobacillus* y *Streptococcus*) una actividad proteolítica muy similar. Las bacterias que desarrollaron la mayor actividad fueron: *Lactobacillus acidóphilus* y el *Streptococcus termóphilus*, presentando una actividad proteolítica real por minuto (APR/min.) de 0.0423 y 0.0413 respectivamente; mientras que el *Lactobacillus bulgáricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus láctis* presentaron una actividad proteolítica real por minuto (APR/min.) de 0.0202, 0.02226, 0.014 y 0.0271. Dicha actividad corresponde a una cierta cantidad de células por ml.; en el cuadro 16 se observa claramente, que en las bacterias en las que se desarrolló la actividad proteolítica más baja (LB, SL y SC) el número de células por ml. fué menor, en comparación con las que presentaron la actividad proteolítica mayor (LA y ST); excepto el *L. Plantarum* que a pesar de ser mayor el número de células por ml. desarrolló una baja hidrólisis de proteína.

V. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos, concuerdan, en general con los de otros investigadores; quienes a pesar de haber utilizando condiciones diferentes para medir la actividad proteolítica de las bacterias acidolácticas encontraron condiciones óptimas muy similares a las encontradas en la presente investigación, en la que se obtuvo como óptimo un pH de 5 y una temperatura de 35 - 37 °C.

5.1. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

De Giori, *et-al.* (1884), reportaron haber obtenido en su investigación, como pH óptimo para desarrollar un máximo de actividad proteolítica de las bacterias acidolácticas de 5.2 a 5.6; mientras que a un pH de 6.6 no observaron hidrólisis de caseína. Dichos resultados fueron obtenidos utilizando para medir la actividad la actividad proteolítica el método Hull.

Por otra parte, Akuzawa, Ito y Yokoyama (1982), obtuvieron pH's óptimos muy altos de 6 variedades de lactobacillus (SL, SC, ST, LA, LB y L. caseí.), donde, las enzimas de SL, LB, L. caseí y LA; fueron estables a un pH de 5 - 7 y las proteínasas de ST y SC se comportaron estables a un pH de 5 - 6. En el cuadro 22 se muestra el pH óptimo reportado por dichos investigadores para cada una de las bacterias utilizadas.

Cuadro 22. pH óptimo para cada una de las bacterias reportado por Akuzawa y colaboradores.

BACTERIAS	pH ÓPTIMO
<i>Streptococcus láctis</i>	8.0
<i>Streptococcus crémoris</i>	6.0
<i>Streptococcus termóphillus</i>	6.0
<i>Lactobacillus acidóphillus</i>	8.0
<i>Lactobacillus bulgáricus</i>	7.0
<i>Lactobacillus casei.</i>	7.0

Ezzat et-al. (1987), reportaron haber obtenido en su investigación como pH óptimo para *Lactobacillus bulgaricus* un pH de 5.5; mientras que, Abu y Abu (1988), encontraron para 14 variedades de *Streptococcus crémoris*, que el mejor pH en el que desarrollaron un máximo de actividad proteolítica fue de 5.0 a 5.2.

5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Akuzawa et-al. (1982), reportaron haber obtenido, en su investigación como temperatura óptima, para una buena hidrólisis de proteína de 6 variedades de bacterias lácticas, de 30 a 40 °C. En el cuadro 23 se muestra la temperatura óptima para cada una de las bacterias que fueron reportadas por dichos investigadores.

Cuadro 23. Temperatura óptima para cada una de las bacterias, reportada por Akuzawa y colaboradores.

BACTERIAS	TEMPERATURA ÓPTIMA
<i>Streptococcus láctis</i>	40
<i>Streptococcus crémoris</i>	40
<i>Streptococcus termóphilus</i>	40
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40
<i>Lactobacillus casei</i>	30

Ezzat et-al. (1987), reportaron para *Lactobacillus bulgaricus* como temperatura óptima 30 °C y Vignolo et-al. (1988), encontraron para 13 variedades de *Lactobacillus plantarum* y 5 variedades de *L casei* (ambas aisladas de salchicha seca), como temperatura óptima en la que desarrollaron la máxima hidrólisis de proteína 40 °C.

En general, los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con los obtenidos por Hegazzi (1987); quien, reporto haber obtenido en su investigación que los lactobacillus eran mas proteolíticos que los estreptococcus, dichos resultados fueron obtenidos utilizando como substrato leche descremada e incubando a 30 °C por 48 hrs. Dicha diferencia en los resultados obtenidos, es muy posible que se deba que dentro de las mismas especie de microorganismos existen variedades de bacterias que poseen actividad proteolítica (+) y actividad proteolítica (-), esto en base a los resultados publicados por HUGENHOLTZ (1987), quién encontró que la actividad proteolítica de los microorganismos depende en gran parte del tipo de especie del microorganismo en cuestión, por ejemplo para el caso de Streptococcus crémoris reportó haber obtenido proteasas (+) y proteasas (-).

VI. CONCLUSIONES

1.- Se obtuvieron como mejores condiciones para evaluar la actividad proteolítica de cada una de las bacterias, el utilizar como solución estándar una solución de pepsina (comercial), como substrato albúmina de suero bovino (comercial) y como buffers una solución de 50 % fosfato de cisteína EDTA y 50 % ácido cítrico 0.05 M (Buffer 2) y una solución de fosfato de cisteína EDTA con ácido cítrico (Buffer 3), dichos resultados provienen de una serie de análisis con diferentes soluciones estándar (pepsina y papaína), diferentes substratos (caseína y albúmina) y diferentes tipos de buffers (Buffer 1, Buffer 2 y Buffer 3).

2.- Bajo las diferentes condiciones de análisis, se obtuvo que no existe diferencia significativa entre bacterias centrifugadas y no centrifugadas.

3.- Existe diferencia significativa entre la actividad proteolítica entre las bacterias entre sí, bajo los diferentes pH's; así como a las diferentes temperaturas, resultando ser un pH de 5 y una temperatura de 37 °C, las condiciones óptimas para todas las bacterias en la que se desarrolla la mejor actividad proteolítica. Sin embargo, en lo individual, para cada una de las bacterias bajo los diferentes pH's y diferentes temperaturas de incubación, no se encontró diferencia significativa en la actividad proteolítica. En cuanto al tiempo de incubación, en el rango utilizado (de 0 a 50 min.) la actividad proteolítica fue directamente proporcional al tiempo de incubación, mostrando para los diferentes tiempos una diferencia significativa; éstos resultados posiblemente se deben a que el rango de tiempo de incubación utilizado, fue relativamente corto y probablemente con un mayor tiempo se pueda definir con más claridad el punto en el cuál se alcanza la máxima hidrólisis de proteína.

4.- En base a la cantidad de μg de proteína por ml. y a la cantidad de células por ml. de cada una de las bacterias bajo las condiciones óptimas de pH, temperatura y tiempo de incubación se concluye, que las bacterias con la máxima actividad proteolítica fueron el *Lactobacillus acidóphillus* y el *Streptococcus termóphillus* y las de menor actividad el *L. plantarum* y el *S. crémoris*.

5.- De todo lo anterior, se puede concluir, que de las bacterias acidolácticas analizadas en la presente investigación (*Lactobacillus acidóphillus*, *Lactobacillus bulgáricus*, *Lactobacillus plantárum*, *Streptococcus termóphillus*, *Streptococcus crémoris* y *Streptococcus láctis*) el *L. acidóphillus* y el *S. termóphillus* son altamente proteolíticos, lo que garantiza su posible utilización no solamente en la industria láctea; sino que también en la industria cárnica (como ablandador, como conservador, etc.); en la industria de los detergentes; en la elaboración de antibióticos; entre otras aplicaciones.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.- En base al coeficiente de variación (CV) demasiado alto y al coeficiente de determinación (R^2) demasiado bajo, obtenidos mediante el análisis de varianza de cada una de las variables, bajo las diferentes condiciones; se recomienda mejorar aún más las condiciones de análisis hasta encontrar las condiciones óptimas para cada bacteria.
- 2.- Para verificar que no existe diferencia significativa entre la actividad proteolítica de los lactobacilos y estreptococos, se recomienda analizar la actividad proteolítica en base a la cantidad de células por ml.; así como utilizar variedades diferentes de una misma especie de microorganismo, para corroborar si la diferencia entre la actividad proteolítica de las diferentes variedades de un mismo microorganismo es aplicable para todas las bacterias acidolácticas.
- 3.- En cuanto a la actividad proteolítica en base al tiempo, donde se obtuvo, que bajo las condiciones de análisis, la actividad proteolítica era directamente proporcional al tiempo de incubación, lo cuál indicaba que aún no se llegaba a su máximo de actividad; debido a lo cual se recomienda por tanto incrementar el rango de tiempo de incubación utilizado.
- 4.- Considerando las condiciones óptimas para cada una de las bacterias, obtenidas en la presente investigación; se recomienda su utilización en futuras investigaciones donde su aplicación sea más práctica, como por ejemplo: evaluar su capacidad como ablandador de carne, su posible utilización en la elaboración de quesos, su utilización como conservador en carnes, su posible utilización en la elaboración de detergentes, en la elaboración de antibióticos, etc.
- 5.- De lo anterior se concluye, que la diferencia en la actividad proteolítica de las 6 variedades de bacterias acidolácticas analizadas en la presente investigación, se debía en

gran parte al número de células por ml., presentando por tanto ambas bacterias una actividad proteolítica muy similar, siendo ligeramente más proteolíticos el *Lactobacillus acidóphillus* y el *Streptococcus termóphillus*, y los menos proteolíticos el *L. plantarum* y el *S. crémoris*. Para verificar dicha observación, se recomienda que al realizar el experimento, en lugar de utilizar como unidad de medición ml. de bacterias, se realice en base a una unidad de células por ml. o una unidad de μg de proteína por ml.

RESUMEN

Las bacterias acidolácticas, son ampliamente utilizadas en la industria de la transformación; principalmente en la láctea (en la elaboración de yoghurt, quesos); en la cárnica (como ablandadores); y demás, por lo que es de suponer que poseen, enzimas que desarrollan cierta actividad de carácter proteolítico (hidrolizan proteínas).

Por tal motivo, la presente investigación se planteó con la finalidad de cuantificar la actividad de las bacterias acidolácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus termophilus*, *S. lactis* y *S. cremoris*); las cuales fueron obtenidas del cepario de microbiología de la FAUANL. Dicha actividad se determinó por el método "Actividad Proteolítica de la Papaína" reportado en el AOAC (Official Methods of Analysis, 1990).

La investigación se desarrollo en varias etapas: en la primera se adecuaron las condiciones óptimas de análisis (solución estándar, substrato y tipo de buffer), las cuales serían utilizadas posteriormente para determinar la actividad proteolítica de cada una de las bacterias; los resultados obtenidos durante ésta etapa fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal; obteniéndose como condiciones ideales para evaluar la actividad proteolítica de dichas bacterias, el utilizar como solución estándar pepsina (comercial); como substrato, albúmina de suero bovino (comercial) y como buffers 50 % fosfato de cisteína EDTA y 50 % ácido cítrico 0.05 M (Buffer 2) y fosfato de cisteína EDTA con ácido cítrico (Buffer 3).

Utilizando dichas condiciones de análisis, la actividad proteolítica de cada una de las bacterias se evaluó bajo diferentes pH's (2.0, 3.0, 3.5, 3.895, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 y 7.5), diferentes temperaturas (25, 30, 35, 37, 40, 45 y 50 °C) y diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 40 y 50 min.). Los resultados obtenidos, se analizaron posteriormente mediante un análisis de varianza, mediante el cual se obtuvo que las mejores condiciones para desarrollar un máximo de actividad un pH de 5 y una temperatura de 37 °C.

Posteriormente, para reportar la actividad proteolítica en base a mg. de proteína por ml. fue necesario determinar la cantidad de proteína en mg./ml. por el método de Lowry; así como la cantidad de células por ml., siendo finalmente el *Lactobacillus acidophilus* la bacteria que mostró tener una mayor actividad proteolítica real por minuto (APR/min = .0423), seguida por el *Streptococcus termophilus* (APR/min = .0413), mientras que el *L. bulgaricus*, *L. plantarum* y el *S. lactis*, desarrollaron una actividad menor, siendo en éstas muy similar (APR/min = .0202, 0.0230 y 0.0271, respectivamente); por otro lado la bacteria que desarrolló la mas baja actividad proteolítica bajo las mismas condiciones de análisis que las anteriores fue el *S. cremoris*, cuya actividad proteolítica (APR/min) fue de 0.0140.

BIBLIOGRAFÍA

ABU, T. H. M. 1988. Protease and Peptidase Activities of Lactic Streptococci as Indicators of Suitability in Cheese Ripening. Dissertation - Abstracts - International, B - Sciences and Engineering. 48: 12, 34-63.

AKUZAWA, R., O. ITO and K. YOKOYAMA. 1982. Proteolytic Activity of Intracellular Extracts of Lactic Acid Bacteria. Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College. 31: 11, 203-207.

BRAVERMAN, J. B. S. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos; tercera edición. Ediciones OMEGA, S.A. Barcelona, España.

CRUEGER, W. and A. CRUEGER. 1982. Biotechnology a Textbook of Industrial Microbiology. Editorial Sinaver Associate, Inc. Sunderland, Ma 01375 and Science Tech, Inc. Madison, WI.

DE GIORI, G. S., G. F. DE VALDEZ, A. P. DE RUIZ HOLGADO and G. OLIVER. 1985. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Bacteria. J. Dairy Sci. 68: 2160-2164.

GILVERY, R. W., 1970. Bioquímica. Editorial Interamericana, S.A. de C.V., de México D.F.

EZZAT, N., C. ZEVACO, M. E. L. SODA, and J. C. GRIPTON. 1987. Partial Purification and Characterization of a Cell Wall Associated Proteinase From *Lactobacillus Bulgaricus*. *Milchwissenschaft*. 42: 2, 95-97.

HANSEN A., 1959. Microbiología de las Fermentaciones Industriales, 7ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza (España).

HARPER, H. A. 1971. Manual de Química Fisiológica, tercera edición. Ed. El Manual Moderno, S.A. México 11, D.F.

HEGAZI, F. Z. 1987. Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria in Skim Milk with Special reference to the Biodegradation of Casein Fractions. *Nahrung*. 31: 1, 12-26.

HOLME, D. J. and H. PECK. 1993. Analytical Biochemistry; 2nd edition. Ed. Longman Scientific and Technical - John Wiley and Sons, Inc. New York.

HUGENHOLTZ, J., R. SPLINT, W. N. KONINGS and H. VELDKAMP. 1987. Selection of Protease Positive and Negative Variants of *Streptococcus cremoris*. Applied and Environmental Microbiology. 53: 2, 309-314.

KENNETH, H. 1990. Official Methods of Analysis. Published by the Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, U.S.A.

KOLSTAD, J. 1990. Peptide Hydrolases of Lactic Acid Bacteria: Starter Activities and Subcellular Localization. Dissertation-Abstracts International, C. Worldwide. 51: 2, 199.

LEHNINGER, A. L. 1972. Bioquímica. Ediciones OMEGA, S.A., Barcelona, España.

LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

MAHLER H. R. and E. H. CORDES. 1971. Química Biológica. Ediciones OMEGA S.A. de C.V., México D.F.

MILLER B. M., Ph.D. and W. LISTKY., Ph.D. 1976. Industrial Microbiology. Ed. Mc Graw-Hill Book Company. U.S.A.

PEREZ J. y P. PEREZ, 1984. Bioquímica y Microbiología de la Leche. Ed. Noriega Limusa, México D.F.

ROSE, A.H. 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Ed. Academic Press, Inc., New York, USA.

SCRIBAN, R. 1985. Biotecnología. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F.

TAMIME, A. Y. and R. K. ROBINSON. 1991. Yogur. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España.

VIGNOLO, G. M., P. DE RUIZ, A. A HOLGADO and G. OLIVER. 1988. Acid Production and Proteolytic Activity of Lactobacillus Strains Isolated from Dry Sausages. Journal of Food Protection. 51: 6, 481-484.

