



2021 © Editorial Instituto Antioqueño de Investigación
Medellín - Antioquia

Edgar Serna M. (Editor)

**Ciencia transdisciplinaria para el
desarrollo y la supervivencia
de la humanidad**

Edgar Serna M. (Editor)

Ciencia transdisciplinar para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad

ISBN: 978-958-53278-4-9

Ciencia transdisciplinaria para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad / editor, Edgar Serna M. -- Medellín:
Instituto Antioqueño de Investigación, 2021.
p. – (Ingeniería y Ciencia)

Incluye referencias bibliográficas.

ISBN 978-958-53278-4-9

1. Ciencias - Investigaciones 2. Ciencias sociales - Investigaciones 3. Ciencias naturales - Investigaciones I. Serna M.,
Edgar, editor ed. II. Serie

CDD: 300.72 ed. 23

CO-BoBN- a1077814

Investigación Científica

ISBN: 978-958-53278-4-9

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.5139646>

Hecho el Depósito Legal Digital

Ciencia transdisciplinaria para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad

Serie: Ingeniería y Ciencia

Editorial Instituto Antioqueño de Investigación

Publicación electrónica gratuita

Edición 1: julio 2021

Copyright © 2021 Instituto Antioqueño de Investigación IAI™. Salvo que se indique lo contrario, el contenido de esta publicación está autorizado bajo Creative Commons Licence CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)

Editorial Instituto Antioqueño de Investigación es Marca Registrada del *Instituto Antioqueño de Investigación*. El resto de marcas mencionadas en el texto pertenecen a sus respectivos propietarios.

La información, hallazgos, puntos de vista y opiniones contenidos en esta publicación son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente los puntos de vista del Instituto Antioqueño de Investigación IAI; no se garantiza la exactitud de la información proporcionada en este texto.

Ni los autores, ni la Editorial, ni el IAI serán responsables de los daños causados, o presuntamente causados, directa o indirectamente, por el contenido en este libro.

Maquetación: Instituto Antioqueño de Investigación IAI

Diseño, edición y publicación: Editorial Instituto Antioqueño de Investigación

Compilador: Edgar Serna M.

Financiado de la publicación: Instituto Antioqueño de Investigación

Instituto Antioqueño de Investigación IAI

Medellín, Antioquia

<http://fundacioniai.org>

contacto@fundacioniai.org

Editorial Instituto Antioqueño de Investigación

<http://fundacioniai.org/index.php/editorial.html>

editorial@fundacioniai.org



Contenido

Prólogo	6
CIENCIAS NATURALES	
Plantas medicinales comercializadas en una zona altoandina del Perú como patrimonio biocultural <i>Walter Wilfredo Ochoa-Yupanqui y Maritza Rodríguez-Lizana</i>	9
Análisis al uso de combustibles limpios para reducir la contaminación del aire en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá AMVA, Colombia <i>Ángel Aristides Vargas Velásquez</i>	17
Degradación de compuestos fenólicos presentes en residuos líquidos agroindustriales mediante fotocátalisis heterogénea <i>Alejandra Gallegos-Alcaíno, Nathaly Robles-Araya, Camila Avalos Briceño, Alexander Alfonso-Álvarez, Adriana Mera Benavides, Carlos Rodríguez, Norma Sánchez-Flores y Francisco Romero-Salguero</i>	27
Desarrollo de un reactor para la producción automatizada de películas delgadas de óxido de zinc por evaporación reactiva asistida por plasma, para ser usadas en la fabricación de celdas solares de área grande <i>Julián Peña-Bermúdez, Gerardo Gordillo-Guzmán y Juan Piña-Jaramillo</i>	40
<i>Agrocybe pediades</i> como bioindicador fúngico: Indicios de sensibilidad al herbicida Paraquat <i>Selena Silva-León, Alba Mónica Montiel González, Laura Verónica Hernández Cuevas y Jaime Marcial Quino</i>	52
Residuo de café transformado en bioplástico <i>Paulina Borunda Baquera, Angélica Hernández Quintero y Elsa Marcela Ramírez López</i>	59
Estudio de la propagación de epidemias en una red de libre escala tipo Barabasi Albert <i>Alexander Santos Niño, Angie Camila Urrego Mendivelso y Tatiana Milena Hernández Novoa</i>	73
Comportamiento micromagnético de nanodiscos de Fe en función del espesor <i>Mauricio Galvis Patiño, Johans Restrepo Cárdenas y Hernán David Salinas</i>	82
CIENCIAS HUMANAS	
Vivencias de afrontamiento para mejorar la calidad de vida en cuidadores primarios de pacientes en condición de discapacidad que generen dependencia <i>Greys Carolina Otero de Oro, Camila Vanessa Daza Alvernia, Lesby Johanna Lora Carrillo y Delia Karina Meza Rojas</i>	93
Discursos filosóficos en las universidades públicas mexicanas: Un análisis exploratorio <i>Ricardo Lindquist Sánchez y Rodolfo García Galván</i>	102
Elementos de política, normativa y prospectiva para un nuevo modelo educativo en México <i>Rodolfo García Galván</i>	115
Comprensión del concepto de derivada a partir de las construcciones de Newton y de Leibniz en el marco de la Enseñanza para la Comprensión: Un estudio de caso de profesores en formación <i>América María Cardona Arias y Zaida Margot Santa Ramírez</i>	131
Análisis de los estilos de aprendizaje en estudiantes de formación en línea mediante el test de dominancia cerebral: Un caso de estudio <i>Gabriela Bohórquez Ramírez y Franklin Santiago Quirós</i>	149
CIENCIAS DE LA VIDA	
Prueba rápida y PCR Covid-19 vs score de indicación TR PCR como método diagnóstico y de evolución en la pandemia de coronavirus <i>Rommer Alex Ortega Martínez Y Patricio Javier Correa Marfull</i>	162

Caracterización de la presencia de <i>plaquetopenia</i> , <i>leucopenia</i> y aumento del hematocrito en la evolución y gravedad de los pacientes con diagnóstico de dengue <i>Rommer Alex Ortega Martínez, Liliana Alejandra Cáceres Sánchez y Jacqueline Borda de Abularach</i>	172
Análisis de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium graminearum</i> , agente causal de fusariosis en trigo (<i>Triticum aestivum</i>) <i>Kate Manuela López-Hernández, Rubén Pérez-Pérez, Salvador Orozco-Montes y Mauricio Nahuam Chávez-Avilés</i>	184
Péptidos antimicrobianos LL-37 y sus derivados frente a microorganismos de importancia clínica: Una alternativa a la resistencia microbiana <i>Paola Santos, Liliana Constanza Muñoz, Claudia Andrea Cruz, Jeannette Navarrete y Gladys Pinilla</i>	197
Validez predictiva del porcentaje de grasa corporal estimado por equipo de bioimpedancia tanita comparado con dilución de óxido de deuterio en escolares costarricenses <i>Juan Diego Zamora Salas y Adriana Laclé Murray</i>	216
Estabilidad a pH y temperatura de proteasas producidas por bacterias aisladas de sedimento marino <i>Nélida Milly Otiniano García, Santiago Benites Castillo, Jessica Vicuña Villacorta, Helí Miranda Chávez y Heber Robles Castillo</i>	224
CIENCIAS SOCIALES	
Rasgos de la personalidad, habilidades y competencias que las personas poseen y ejecutan en los procesos de negociación: Una revisión de la literatura <i>Gabriel Jaime Saldarriaga Ruiz, Andrés Felipe Londoño Vélez, Carlos Alberto Ramírez Cárcamo y Caterin Bibiana Giraldo Giraldo</i>	236
La gestión de la calidad y su efecto en el desarrollo de la exploración organizativa. Una investigación empírica en la industria agroalimentaria ecológica <i>Aldo Giovanni Caypa Altare y María D. Moreno-Luzón</i>	251
El negro en Colombia: Una traza de violencia que inició en la colonia y continúa en la época contemporánea <i>Jesús Guillermo Banquez Mendoza, Marina Begoña Martínez González y José Amar Amar</i>	266
Afectaciones por el ingreso del Covid-19: Acciones para detener la pandemia y población de riesgo en la ciudad Puerto de Manzanillo, México <i>Lilia Susana Padilla y Sotelo y Rosa Alejandrina De Sicilia Muñoz</i>	275
Estudio comparativo de las emociones ambientales y la experiencia espacial arquitectónica en el Perez Art Museum en Miami y el edificio de la fundación Louis Vuitton en París <i>Mauricio Cabas</i>	292
Propuesta de proyecto de integración regional para Centroamérica <i>Venancio Gerardo Calva Olmos y Mario Pacchiano de la Garza</i>	304
Análisis prospectivo para la reducción de la vulnerabilidad de la sociedad ante fenómenos naturales <i>María del Rocío Guadalupe Morales Salgado, Fabián Leonardo Yory Sanabria, Juan Pablo Salazar Giraldo y Manuel Alberto Pérez Coutiño</i>	318
Resiliencia de un territorio masewal en Cuetzalan del Progreso, México, ante la presión de urbanización <i>Jazmín Arias Hernández</i>	330
Formas, sonidos e imágenes en la ciudad discapacitada: Una aproximación a la percepción del espacio y su función social <i>Andrea del Pilar Arenas, Juan Manuel Aldana Porras y Edwin Dorance Garzón Carrillo</i>	349
Traductor de significantes a lengua de señas: La tecnología asistiva como mediadora de la interacción comunicativa sordo-oyente <i>John Fredy Montes Mora y Gloria Esperanza Castellanos G.</i>	362

- Garby, L., Lammert, O. y Nielsen, E. (1990). Negligible effects of previous moderate physical activity and changes in environmental temperature on whole body electrical impedance. *European Journal of Clinical Nutrition* 44, 545-556.
- Haroun, D., Taylor, S., Viner, R. et al. (2010). Validation of Bioelectrical Impedance Analysis in Adolescents Across Different Ethnic Groups. *Obesity* 18, 1252-1259.
- Kain, J., Corvalán, C., Lera, L., Galván, M. y Uauy, R. (2009). Accelerated growth in early life and obesity in preschool Chilean children. *Obesity* 17, 1603-1608.
- Katzmarzyk, P.T., Baur, L.A., Blair, S.N. et al. (2008). Summary statement and recommendations. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 33, 371-388.
- Knechtle, B., Wirth, A., Knechtle, P., Rosemann, T., Rust, C. y Bescos, R. (2011). A comparison of fat mass and skeletal muscle mass estimation in male ultra-endurance athletes using bioelectrical impedance analysis and different anthropometric methods. *Nutrición Hospitalaria* 26(6), 1420-1427.
- Lizzer, S., Bedogni, G., Agosti, F., De Col, A., Mornati, D. y Sartorio, A. (2008). Comparison of dual-energy X-ray absorptiometry, air displacement plethysmography and bioelectrical impedance analysis for the assessment of body composition in severely obese Caucasian children and adolescents. *British J. of Nutrition* 100, 918-924.
- Lee, O. y McCargar, L. (2009). Prevention of overweight and obesity in children under the age of 6 years. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 34, 551-570.
- Lin, L. (1985). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45, 255-268.
- Lohman, T. (1981). Skinfolts and body density and their relation to body fatness: A review. *Human Biology* 53, 181-225.
- Madeira, F.B., Silva, A.A., Veloso, H.F. et al. (2013). Normal weight obesity is associated with metabolic syndrome and insulin resistance in young adults from a middle-income country. *PloS One* 8(3), 660-673.
- Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A. y Carter, L. (2006). *International standards for anthropometric assessment*. Potchefstroom.
- Mihanoupolos, N., Holubkob, R., Young, P., Dai, S. y Labarthe, D. (2010). Expected Changes in Clinical Measures of Adiposity during Puberty. *Journal of Adolescent Health* 47, 360-366.
- Ministerio de Educación Pública. (2016). Informe Ejecutivo Censo Peso/Talla. Recuperado: <http://www.mep.go.cr/sites/default/files/page/adjuntos/informe-ejecutivo-censo-escolar-peso-cortofinal.pdf>
- Ogden, C.L., Carroll, M.D., Curtin, L.R. et al. (2006). Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 295, 1549-1555.
- Pereira, A.P., Seabra, T.A., Silva, G.R. et al. (2010). Prevalence of Overweight, Obesity and Physical Activity Levels in Children from Azores Islands. *Annals of Human Biology* 37(5), 682-691.
- Pirinçci, E., Durmus, B., Gündo-Gdu, C. y Açıık, Y. (2010). Prevalence and Risk factors of Overweight and Obesity among Urban School Children in Elazing City (Eastern Turkey, 2007). *Annals of Human Biology* 37(1), 44-56.
- Prins, M., Hawkesworth, S., Wright, A., Fulford, A. et al. (2008). Use of bioelectrical impedance analysis to assess body composition in rural Gambian children. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 1065-1074.
- Ramírez, E., Valencia, M., Bourges, H., Espinoza, T. et al. (2012). Body composition prediction equations based on deuterium oxide dilution method in Mexican children: a national study. *European Journal of Clinical Nutrition* 66, 1099-1103.
- Resende, C.M., Camelo, J.S., Vieira, M.N. et al. (2011). Body composition measures of obese adolescents by the deuterium oxide dilution method and by bioelectrical impedance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44(11), 1164-1170.
- Ricciardi, R. y Talbot, L. (2007). Use of bioelectrical impedance analysis in the evaluation, treatment, and prevention of overweight and obesity. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 19 (5), 235-241.
- Sala, A., Webber, C.E., Morrison, J., Beaumont, L.F. y Barr, R.D. (2007). Whole-Body Bone Mineral content, Lean Body Mass, and Fat mass Measured by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in a Population of Normal Canadian Children and Adolescents. *Canadian Association of Radiologists Journal* 58, 46-52.
- Salazar, G., Infante, C. y Vio, F. (1994). Deuterium equilibration time in infant's body water. *European Journal of Clinical Nutrition* 48, 475-481.
- Schoeller, D. (2000). Bioelectrical impedance analysis. What does it measure? *Annals of the New York Academy of Sciences* 904, 159-162.
- Silva, M.I., Vale, B.S., Lemos, C.C., Torres, M.R. y Bregman, R. (2013). Body adiposity index assess body fat with high accuracy in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Obesity* 21, 546-552.
- Wells, J. y Fewtrell, M. (2006). Measuring body composition. *Archives of Disease in Childhood* 91, 612-617.
- World Medical Assembly. (2013). *Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research on Human Beings*. 64th General Assembly.
- Zhang, Z.Q., Liu, Y.H., Xu, Y. et al. (2014). The validity of the body adiposity index in predicting percentage body fat and cardiovascular risk factors among Chinese. *Clinical Endocrinology* 81, 356-362.

Estabilidad a pH y temperatura de proteasas producidas por bacterias aisladas de sedimento marino

Nélida Milly Otiniano García¹

Santiago Benites Castillo²

Jessica Vicuña Villacorta³

Helí Miranda Chávez⁴

Heber Robles Castillo⁵

¹⁻³Universidad César Vallejo

⁴Universidad Católica de Trujillo Benedicto XVI

⁵Universidad Nacional de Trujillo
Perú

Se evaluó la estabilidad frente a pH y temperatura de proteasas producidas por tres cepas del género *Bacillus* aisladas de sedimento marino del balneario de Huanchaco, Trujillo, Perú. La selección primaria de bacterias productoras de proteasas se realizó por siembra en placas con agar Caseína Almidón y agar leche al 1%, seleccionándose tres cepas con halo de hidrólisis mayor o igual a 3 mm. Las bacterias fueron identificadas como *Bacillus* spp, usando el sistema API 50 CHB y VITEK 2. La producción de proteasas se realizó en medio líquido suplementado con caseína, en un biorreactor de tanque aireado y agitado. Las enzimas se extrajeron por filtración y centrifugación a 10 000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El filtrado se precipitó con sulfato de amonio y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min., el pellet se disolvió en 0,1 M de fosfato tampón, pH 7 y se dializó durante 16 horas. Para evaluar la estabilidad al pH, se emplearon tampones de citrato (pH 5), fosfato 0,1 M (pH 7), y Tris 0,1 M (pH 9). La actividad de la proteasa se midió por espectrofotometría a 440 nm., utilizando caseína 1% como sustrato. Las proteínas residuales se determinaron por la técnica de Biuret, y se calculó la cantidad de proteína hidrolizada en mg/mL. Se siguió el mismo procedimiento para evaluar la estabilidad de las proteasas a la temperatura, incubando la mezcla enzima sustrato en el rango de temperaturas de 20 a 60°C. Para el análisis de datos, se aplicó la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples HSD Turkey para alfa = 0,05. Se observó que la proteasa producida por la cepa de *Bacillus* spp M1B-PB, es estable a pH 5, 7 y 9 y en el rango de temperatura de 30 a 60°C. Las proteasas producidas por la cepa M1A-PA son estables a pH 7 y 9 y en el rango de temperatura de 40 a 60°C. Las proteasas producidas por la cepa M1B-PA no son estables a los cambios de pH, pero presentan estabilidad en el rango de temperatura de 40 a 60°C.

¹ Contacto: notiniano@ucv.edu.pe

² Contacto: sbenites@ucv.edu.pe

³ Contacto: jvicuna@ucv.edu.pe

⁴ Contacto: amiranda@uct.edu.pe

⁵ Contacto: hrobles@unitru.edu.pe

1. INTRODUCCIÓN

Se proyecta que el mercado mundial de enzimas crecerá de \$ 5.01 mil millones en 2016 a \$ 6.32 mil millones en 2021 (Chapman et al., 2018). El mercado de enzimas industriales se valoró en más de USD 6300 millones en 2020 y se proyecta que el mercado registre una tasa compuesta anual de más del 6% durante el período de pronóstico (2021-2026). Además, el procesamiento de alimentos domina el mercado de las enzimas industriales con una participación total de más del 35%. Este es el segmento de aplicaciones de más rápido crecimiento, apoyado principalmente por la población mundial en constante crecimiento y su creciente poder adquisitivo. La conciencia sobre la salud también es un factor para la creciente demanda de calidad alimentaria, procesamiento productivo más seguro y valor nutricional mejorado (Mordor intelligence, 2020).

Las proteasas constituyen uno de los grupos más grandes de enzimas hidrolíticas y representan aproximadamente el 65% de las enzimas industriales más vendidas a nivel mundial (Ibrahim et al., 2015; Jisha et al., 2013), estas enzimas catalizan la hidrólisis de proteínas por ruptura de los enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos de otras proteínas (Ibrahim et al., 2015). Entre todas las enzimas, las proteasas ocupan un lugar muy importante, pues fueron las primeras en ser producidas a granel (Cui et al., 2015). Las fuentes de proteasas son diversas, éstas son producidas por plantas, animales y microorganismos, siendo las proteasas bacterianas las que han sido más explotadas con fines comerciales (Haddar et al., 2010; Wang et al., 2012).

Las proteasas microbianas constituyen aproximadamente el 40% de la producción mundial de enzimas (Ibrahim et al., 2015). Se prefiere la producción de proteasas microbianas debido a su naturaleza extracelular (Hakim et al., 2018), bajo costo de producción, y a que son relativamente más estables y activas que las proteasas animales y vegetales (Bhandari et al., 2021; Cui et al., 2015). En el mercado de las enzimas, se han reportado más de 3000 enzimas microbianas extracelulares diferentes (Cui et al., 2015). Dependiendo de la especie o de la cepa, los microorganismos producen una variedad de proteasas, entre las que se encuentran las proteasas neutras y alcalinas, que tienen un potencial de aplicación excelente en la industria de detergentes y curtido de cuero (Jisha et al., 2013). Las enzimas microbianas son biocatalizadores que pueden ser utilizados como una alternativa en los procesos químicos industriales (Sirvas et al., 2021), ya que en la actualidad existe una tendencia a desarrollar tecnologías limpias para proteger el ambiente.

En función de la posición de escisión de los enlaces peptídicos, las proteasas se clasifican en exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas) y endopeptidasas (serina, cisteína, aspártica, metalo, treonina, endopeptidasas glutámicas y péptido liasas de asparagina). De acuerdo al pH, las proteasas pueden ser alcalinas, neutras y ácidas. Entre ellas, las proteasas alcalinas son muy importantes en la industrias ya que tienen la capacidad de soportar condiciones de pH más altas (Saggu y Mishra, 2017).

Las serín proteasas alcalinas constituyen el grupo más dominante de enzimas producidas por bacterias, mohos y levaduras (Jisha et al., 2013). Las proteasas alcalinas con alta actividad y estabilidad en un amplio rango alcalino, tienen varias aplicaciones en biotecnología y bioingeniería. Sin embargo, su aplicación principal está en la industria de detergentes, lo que representa aproximadamente el 30% del total de la producción de enzimas. Además, tienen otras aplicaciones entre las que se incluyen en la industria del cuero, farmacéutica (Saggu y Mishra, 2017), procesamiento de proteínas, alimentos como quesos, bebidas y panadería, reactivos de diagnóstico, síntesis de péptidos, recuperación de plata de las placas de radiografías (Coker, 2016; Ibrahim et al., 2015) y en varios procesos de biorremediación (Bhandari et al., 2021; Cui et al., 2015; Hakim et al., 2018; Jisha et al., 2013).

Estas enzimas también pueden utilizarse para resolver problemas ambientales reduciendo el impacto causado por los residuos generados en algunas actividades de la industria acuícola como la producción de camarones, que si bien es cierto provee de una proteína muy rica para el consumo humano, las granjas camaroneras también generan una gran cantidad de residuos de caparazón, que pueden representar hasta el 48 – 56% del peso crudo del camarón, que si no se dispone correctamente podría generar un problema de contaminación. El empleo de enzimas microbianas específicas para manejar este problema podría ser un interesante logro muy amigable para el ambiente (Sirvas et al., 2021).

Existe una amplia gama de microorganismos productores de proteasas entre los que se incluyen bacterias, mohos y levaduras; sin embargo, se prefiere trabajar con bacterias porque presentan una extensa diversidad bioquímica, crecen rápidamente, necesitan menos espacio, los cultivos pueden mantenerse fácilmente y son más accesibles a manipulaciones genéticas. Las especies de bacterias importantes para la producción de proteasas son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Arthrobacter* y *Serratia*. Entre todas las especies bacterianas, los *Bacillus spp.* desempeñan un papel preponderante debido a su capacidad de secretar un alto nivel de proteasa alcalina y a sus características químico organotróficas (Cui et al., 2015), por lo que son los microbios mayoritariamente explotados comercialmente para la producción de proteasas (Razzaq et al., 2019).

En la actualidad, se está prestando mucha atención a los microorganismos marinos, ya que se ha visto que producen una amplia gama de enzimas que son relativamente más estables y activas que las enzimas derivadas de plantas o animales y tendrían más ventajas que las enzimas tradicionales, así, mientras las serín proteasas alcalinas de otras fuentes son activas en un amplio rango de temperatura (de 35 – 80°C) y pH (de 7 – 12), las proteasas producidas por bacterias marinas tienen actividad y estabilidad significativas a pH y temperaturas altos (Cui et al., 2015).

El estudio de las proteasas termoestables es importante para los sectores biotecnológico e industrial debido a su estabilidad frente a agentes desnaturizante y químicos. Casi el 65% de las proteasas industriales se aíslan de fuentes microbianas marinas y pueden resistir una amplia gama de disolventes orgánicos a altas temperaturas. El rasgo más importante de los organismos marinos es su adaptabilidad, lo que les permite crecer de manera óptima en entornos hostiles como el alto contenido de sal, altas temperaturas y presiones, características de las aguas termales, de aguas profundas y los sedimentos geotérmicos (Barzkar et al., 2018).

Muchos investigadores se han interesado por estudiar la producción de proteasas termoestables, así Ahmad et al. (2020) trataron de optimizar las condiciones para lograr un alto nivel de producción de proteasa de *Geobacillus* SBS-4S, y encontraron que al suplementar el medio de cultivo con 2% de extracto de levadura o 5% de salvado de trigo, se aumentó la producción de proteasa de 10.6 a 24.4 U / mL o 34.5 U / mL respectivamente. Así mismo, observaron que en condiciones óptimas podrían producir 46,2 U / mL de proteasa. La actividad máxima de la enzima se logró a 60°C y pH 9,0. Los estudios de termoestabilidad demostraron que la proteína era estable con un 50% de actividad residual después de una incubación de 2 horas y 25 min a 60°C en presencia de Mn²⁺ + 1 mM. Los estudios cinéticos demostraron los valores de Km y Vmax de 16,67 mg / mL y 143 U / m., respectivamente. Concluyeron que la estabilidad de la proteasa se logra en un amplio rango de pH y temperatura lo que hace que esta enzima sea adecuada para su utilización en la industria de alimentos para aves y detergentes.

Si et al. (2018), purificaron y caracterizaron una proteasa microbiana producida extracelularmente por *Bacillus subtilis* FBL-1. Para la purificación, realizaron la precipitación del caldo de fermentación con sulfato de amonio. Observaron que aunque la proteasa purificada mostró la actividad más alta a 45°C y pH 9,0, la actividad permaneció estable en el rango de temperatura de 30 a 50°C y el rango de pH de 7,0 a 9,0. La proteasa fue activada por iones metálicos como Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺ y K⁺, pero Fe³⁺ 10 mM inhibió significativamente la actividad enzimática (53%). La actividad proteasa fue inhibida por EDTA 2 mM como inhibidor de metaloproteasas, pero mostró buena estabilidad frente a tensioactivos y disolventes orgánicos.

Hou et al. (2017), purificaron y caracterizaron una proteasa alcalina secretada por *Micrococcus* NH₅4PCO₂ aislada del Mar de China Meridional. La proteasa se purificó con 3 pasos que incluían precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba con un aumento de 8,22 veces en la actividad específica y un aumento del 23,68% en la recuperación. La masa molecular de la proteasa se estimó en 25 kDa mediante análisis SDS-PAGE. La temperatura y el pH óptimos para la actividad de la proteasa fueron 50°C y pH 10,0, respectivamente. La proteasa mostró una fuerte estabilidad en una amplia gama de valores de pH que oscilaban entre 6,0 y 11,0 y mantuvo una actividad enzimática del 90% en un entorno alcalino fuerte con un pH de 11,0.

Por otro lado, Salem et al. (2016), evaluaron a *Bacillus licheniformis* RBS 5 termofílico, aislado de una fuente termal Tunecina, que produce alfa amilasa y proteasa alcalina termoestables. La alfa amilasa fue estable en el rango de 45 a 70°C después de 30 minutos de incubación y en el rango de pH de 8 a 10 y mostró una actividad de α -amilasa óptima a aproximadamente 65°C y en un amplio intervalo de pH que oscilaba entre 4 a 9. La actividad de la proteasa fue estable hasta los 60°C en un rango de pH de 10 a 12, y alcanzó su actividad óptima a 80°C, pH 12. Así mismo, observaron que el EDTA a una concentración de 5 mM reduce ligeramente ambas actividades y, que los iones catiónicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+}) tienen un efecto de inhibición sobre la α -amilasa. Sin embargo, la actividad proteasa fue potenciada por Ca^{2+} , Cu^{2+} y Mg^{2+} ; los otros cationes reducen ligeramente la actividad proteolítica. SDS y H_2O_2 actuaron como inhibidores de ambas actividades, mientras que Triton X-100 y el perfume no tuvieron ningún efecto. Estas características hacen que la actividad de la proteasa de *B. licheniformis* RBS 5 sea muy eficiente para su uso en la industria de detergentes.

EL-Eskafy et al. (2016), aislaron una bacteria marina de la región del Mar Rojo en Egipto que fue capaz de producir proteasas termoestables, esta bacteria fue identificada morfológica, bioquímica y molecularmente por secuenciación de ARNr 16S con un 98% de similitud con *Bacillus amyloliquefaciens*. Las enzimas presentaron una actividad óptima de 363,4 U / mL a 65°C y pH 7 durante diez minutos. Se observó que tanto el sulfato de amonio como los métodos de purificación con Sephadex G-100 redujeron la actividad específica a 256,4 y 153,4 U / mL. Sin embargo, la actividad aumentó 3.8 veces cuando se usó Tween-80 como tensioactivo. Se analizaron los antecedentes genéticos de los genes de proteasa en *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando una base de datos bioinformática y se determinó que *Bacillus amyloliquefaciens* tiene cinco diferentes genes de proteasa que codifican varios grupos de familias de peptidasas, esta variación en la familia de las peptidasas proporciona a las proteasas muchas características que las hacen capaces de permanecer activas bajo diversas condiciones ambientales. La enzima producida mostró una buena actividad entre 65°C y 85°C. Mientras que la adición de metal iones inhibieron la actividad enzimática.

El rasgo más importante de los organismos marinos es su adaptabilidad, lo que les permite crecer de manera óptima en entornos hostiles como el alto contenido de sal, temperaturas y presión, casi el 65% de las proteasas industriales se aíslan de fuentes microbianas marinas y se ha observado que éstas pueden resistir significativamente una amplia gama de disolventes orgánicos a altas temperaturas, lo que las hace muy importantes en los sectores biotecnológico e industrial (Barzkar et al., 2018).

La importancia económica de las enzimas microbianas radica en que pueden aplicarse en diversas tecnologías que emplean procesos ecológicos. Los microorganismos son fáciles de cultivar en biorreactores bajo condiciones de crecimiento controlables, tales como, pH, temperatura, aireación, composición del medio y otros parámetros, lo que conduce y asegura una alta reproducibilidad. Lo que no ocurre con las enzimas aisladas a partir de plantas y animales, las cuales presentan una serie de limitaciones como la composición del suelo, la incidencia de luz, la homogeneidad de las semillas, el control de patógenos y otros problemas que dificultan la reproducibilidad de estos procesos, y los hacen más costosos.

Teniendo en cuenta los antecedentes favorables sobre la estabilidad de las enzimas producidas por microorganismos marinos, y su potencial de aplicación en múltiples procesos industriales, es que se plantea esta investigación con la finalidad de obtener enzimas proteolíticas estables a pH y temperatura que más adelante puedan ser utilizadas en diversas industrias. Por ello, la presente investigación se realizó con el principal objetivo de evaluar la estabilidad a pH y temperatura de proteasas producidas por bacterias aisladas de sedimento marino del balneario de Huanchaco, Trujillo, Perú.

2. MÉTODO

2.1 Tipo de estudio y diseño de investigación

Se realizó un estudio cuantitativo, pre experimental y se trabajó con sedimento marino obtenido a 5 metros de profundidad de la costa de Huanchaco, Trujillo, La Libertad, Perú. Ubicado a una latitud de -8.08, Longitud: -79.1206 8° 4' 48" Sur, 79° 7' 14" al oeste. Latitud S8°0' 2.92.

2.2 Colección de muestras marinas

Se colectaron cinco muestras de sedimento a cinco metros de profundidad, en bolsas de polipropileno de primer uso, las muestras recogidas se rotularon teniendo en cuenta los siguientes datos: Temperatura, lugar, hora, fecha, ubicación con GPS. Luego se empacaron en cadena de frío y se trasladaron al laboratorio del Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo, para su procesamiento.

2.3 Aislamiento de microorganismos marinos

Las muestras recolectadas fueron diluidas en series decimales en agua de mar natural estéril, hasta 10^{-5} . A partir de las diluciones se extrajo una alícuota de 0,1 mL de suspensión y se sembró por superficie en placas de agar caseína de almidón (SCA) que contiene: 10g de almidón soluble, 0,3 g de caseína libre caseína de vitaminas, 2 g de KNO_3 , 2 g de NaCl, 2 g de K_2HPO_4 , 0,05g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 de $CaCO_3$, 0.01 de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g de agar en 1L de agua de mar natural estéril a pH 7.0 ± 0.2 . Además, se agregó cicloheximida a concentración de 50 lg/mL para minimizar la contaminación. Luego, las placas fueron incubadas a temperatura ambiental ($20 \pm 2^\circ C$).

Las bacterias aisladas se subcultivaron en SCA para determinar su pureza, y características como tamaño, forma y crecimiento, pigmentación y producción de exopolisacáridos (EPS), durante 3-5 días para lograr una buena esporulación.

2.4 Selección primaria de producción de proteasas

Todas las bacterias aisladas fueron seleccionadas para la producción de proteasas utilizando agar con 2% de leche, las placas se incubaron a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ C$). Después de 48 horas, las placas fueron examinadas para ver zonas claras de lisis alrededor de las colonias. Los microorganismos que presentaban halo de hidrólisis de 3 mm alrededor de las colonias fueron seleccionados para proceder a su identificación.

2.5 Identificación de microorganismos:

Los microorganismos se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas, tintoriales y pruebas bioquímicas según el manual de Bergey (Garrity et al., 2010), y utilizando el sistema API 50 CHB y el sistema VITEK 2 Biomeriux para identificación de bacterias gran positivas.

2.6 Producción de proteasas en medio líquido

Para estimular la producción de proteasas por los cultivos, se prepararon dos medios diferentes: el caldo de producción de proteasas (PPB) que contiene: (g / L) peptona 10g, sacarosa 10g, K_2HPO_4 0,5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g, NaCl 0,5g, $CaCl_2$ 0,5g a pH 7 y el caldo malta extracto de levadura (MYEB) que contiene: (g / L) maltosa 10g, extracto de levadura 2g, extracto de carne 1g, a pH 7 (Ramesh et al., 2009). Los medios fueron agregados a biorreactores de tanque aireado y agitado a 120 RPM, se inocularon con los cultivos aislados y se incubaron a T° ambiental ($22 \pm 2^\circ C$) durante 24-48 horas.

2.6.1 Preparación de los cultivos

Después del crecimiento en el medio líquido respectivo por el tiempo requerido, los cultivos fueron sembrados en tubos con Agar leche 2% para el ensayo cualitativo de la actividad proteolítica.

2.6.2 Ensayo cualitativo de las proteasas y selección primaria

Se prepararon placas Petri con agar leche al 2%, luego, se sembró cada cultivo aislado por puntura y se incubó a temperatura ambiental ($22 \pm 2^\circ C$) durante 24 a 48 horas, después de este tiempo, se visualizó la actividad de la enzima por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias de bacterias, producidas por la hidrólisis de la caseína de la leche, luego se procedió a medir el diámetro de la zona de hidrólisis con una regla Bernier.

2.6.3 Producción y separación de la proteasa a partir del medio de cultivo

Se sembró cada uno de los cultivos en medio líquido suplementado con caseína, y se colocaron en biorreactor de tanque aireado y agitado durante 48 horas, luego para separar las células bacterianas, primero se filtró a través del papel de filtro Whatman N° 1 y el líquido filtrado se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 15 min. Al filtrado se le agregó sulfato de amonio hasta un 85% de saturación con agitación intermitente en agitador orbital, y posteriormente se mantuvo con agitación suave durante 8 horas utilizando un agitador magnético (Ramesh et al., 2009).

2.6.4 Purificación parcial de la enzima

Para separar la proteína del medio de cultivo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min y el pellet obtenido se disolvió en 0,1 M de fosfato tampón pH 7, luego se dializó en el mismo tampón durante 16 horas. Esta enzima parcialmente purificada fue reservada a -20°C para los ensayos de estabilidad. Todo el procedimiento de purificación se realizó a 4°C para evitar la desnaturalización de la enzima (Mathew y Gunathilaka, 2015; Ramesh et al., 2009).

2.7 Evaluación de la estabilidad de la enzima frente al pH

En tubos de ensayo rotulados con los diferentes pH, se colocó 50 uL de la enzima parcialmente purificada se llevó a 0,5 mL con diferentes tampones de pH y se agregaron 0,5 mL de caseína al 1%. Los tampones utilizados para diferentes pH fueron: 0,1 M de tampón de citrato (pH 5), tampón de fosfato 0,1 M (pH 7) y Tris 0,1 M tampón (pH 9) (Ramesh et al., 2009). Las mezclas de enzima y sustrato se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos, luego, la reacción se paralizó añadiendo 1 mL de TCA al 10%. La actividad de la proteasa se midió por espectrofotometría a 440 nm. Para la determinación de proteínas residuales se empleó la técnica de Biuret, luego por diferencia con la concentración inicial de caseína, se calculó la cantidad de proteína hidrolizada en mg/mL.

2.8 Evaluación de la estabilidad de la enzima frente a la temperatura

Se colocaron varias alícuotas de 50 uL de la enzima parcialmente purificada en tubos de ensayo debidamente rotulados y se llevaron hasta un volumen de 0,5 mL con agua destilada estéril, luego se agregó 0,5 mL de caseína al 1%. La enzima y las mezclas de sustrato se incubaron a diferentes temperaturas (20-60°C). Después de 60 minutos, la reacción se terminó agregando 1 mL de TCA.10%, luego, se ensayó la actividad de la proteasa como se describió anteriormente para determinar la estabilidad al pH (Ramesh et al., 2009).

2.9 Métodos de análisis de datos

De cada uno de los cultivos evaluados, se calcularon los promedios de proteína hidrolizada en mg/mL obtenida a diferentes valores de temperatura, luego se realizaron pruebas de normalidad y posteriormente se aplicó la prueba de ANOVA para comparar los promedios de proteína hidrolizada obtenida en las diferentes temperaturas, se siguió el mismo procedimiento para los ensayos de estabilidad al pH. También se realizaron pruebas de comparaciones múltiples HSD Tukey para determinar los subconjuntos homogéneos para alfa = 0.05.

3. RESULTADOS

3.1 Selección primaria de microorganismos productores de proteasas

Se aislaron doce cepas de microorganismos con capacidad proteolítica, de allí se procedió a la medición de los halos de hidrólisis (Figura 1), y seleccionaron las tres cepas que presentaron el mayor halo de hidrólisis de proteínas, que se presentan en la Tabla 1, en donde se puede observar que la cepa de *Bacillus* spp M1B-PA es la que presenta el halo de hidrólisis mayor.

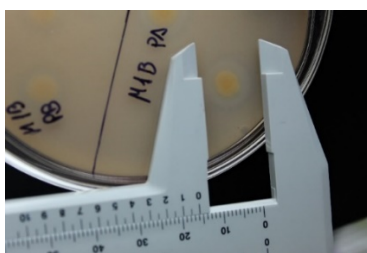


Figura 1. Medida de los halos de degradación de proteínas por *Bacillus* spp aislados de sedimento marino del balneario de Huanchaco

Tabla 1. Diámetro promedio del halo de degradación de proteínas por tres cepas de *Bacillus* spp. aislados de sedimento marino del balneario de Huanchaco

Código	Género	24 horas		48 horas	
		Diámetro colonia (mm)	Diámetro del halo (mm)	Diámetro colonia (mm)	Diámetro del halo (mm)
M1A-PA	<i>Bacillus</i>	1	3	2	5
M1B-PA	<i>Bacillus</i>	2	7	6	12
M1B-PB	<i>Bacillus</i>	2	6	5	8

En la coloración Gram se observó bacilos gran positivos esporulados (Figura 2), con características morfológicas y bioquímicas acordes al género *Bacillus*. No se pudo determinar la especie, pues al parecer, como se trata de bacterias marinas aún no están tipificadas en los estándares de las pruebas utilizadas de API 50 CHB y VITEK 2.

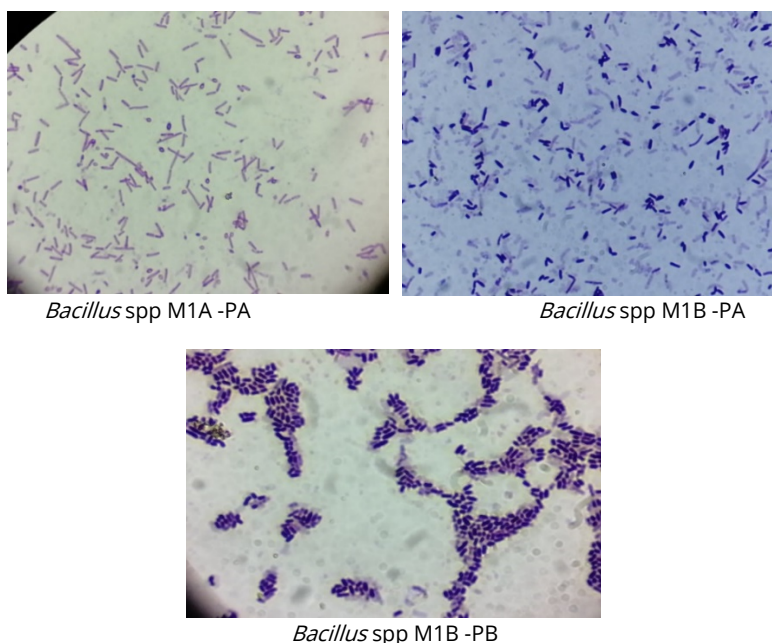


Figura 2. Bacterias del género *Bacillus* productoras de proteasas, aisladas de sedimento marino del balneario de Huanchaco. Trujillo. Observación con tinción Gram y a 1000x

3.2 Evaluación de la estabilidad de las proteasas frente al pH y temperatura

En la Tabla 2 se presentan los promedios de proteína hidrolizada por las proteasas producidas por las tres cepas de *Bacillus* spp, los cuales fueron comparados mediante la prueba de ANOVA, y se obtuvo una significancia igual a 0.00, lo que indica que existe diferencia en por lo menos uno de los promedios de proteína hidrolizada obtenidos al evaluar la actividad hidrolítica frente a diferentes valores de pH.

En la Tabla 3, la prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey, muestra los subconjuntos homogéneos, de los promedios de proteína hidrolizada obtenidos en los ensayos con diferentes valores de pH, que no presentan diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$), lo que indicaría que la actividad enzimática no varía con los cambios de pH, como ocurre con la cepa M1A-PA a pH 7 y 9 y la cepa M1B-PB a pH 5, 7 y 9, lo que sería un indicador que la actividad de la enzima es estable en esas condiciones.

Tabla 2. Promedios de proteína hidrolizada obtenidos al evaluar la estabilidad frente al pH de las proteasas producidas por microorganismos aislados de sedimento marino del balneario de Huanchaco

pH	<i>Bacillus spp. M1A-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PB</i>	
	Proteína hidrolizada (mg/mL)		Proteína hidrolizada (mg/mL)		Proteína hidrolizada (mg/mL)	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
5	2,48	0,030	2,18	0,025	4,05	0,048
7	5,67	0,026	2,09	0,048	3,92	0,434
9	5,69	0,021	1,66	0,029	3,99	0,042
Significancia (ANOVA)	0,000		0,000		0,818	

Tabla 3. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey Subconjuntos homogéneos para alfa = 0.05

pH	<i>Bacillus spp. M1A-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PA</i>			<i>Bacillus spp. M1B-PB</i>	
	1	2	1	2	3	1	2
5	2,483157		2,184393			4,054537	
7	5,672277		2,091607			4,054537	
9	5,687747		1,658910			3,992713	
Significancia	1,000	0,754	1,000	1,000	1,000	0,803	

En la Tabla 4, se pueden observar los promedios de proteína hidrolizada por las proteasas producidas por las tres cepas de *Bacillus spp.*, a diferentes temperaturas, los cuales fueron comparados mediante la prueba de ANOVA, y se obtuvo una significancia igual a 0.00, que indica que existe diferencia en por lo menos uno de los promedios de proteína hidrolizada obtenidos al evaluar la actividad hidrolítica en condiciones diferentes de temperatura.

Tabla 4. Promedios de proteína hidrolizada obtenidos al evaluar la estabilidad frente a la temperatura de las proteasas producidas por microorganismos aislados de sedimento marino del balneario de Huanchaco.

Temperatura°C	<i>Bacillus spp. M1A-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PB</i>	
	Proteína hidrolizada (mg/mL)		Proteína hidrolizada (mg/mL)		Proteína hidrolizada (mg/mL)	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
20	4,76	0,090	4,47	0,016	5,06	0,052
30	4,64	0,075	4,30	0,044	4,85	0,014
40	4,35	0,056	4,09	0,064	4,85	0,069
50	4,33	0,056	4,14	0,017	4,85	0,032
60	4,27	0,090	4,21	0,071	4,74	0,053
Significancia (ANOVA)	0,000		0,000		0,000	

En la Tabla 5, la prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey, muestra los subconjuntos homogéneos, de los promedios de proteína hidrolizada obtenidos en los ensayos en diferentes condiciones de temperatura, que no presentan diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$), lo que indicaría que la actividad enzimática no varía con los cambios de temperatura, como ocurre con la cepa M1A-PA y M1B-PA a temperaturas de 40, 50 y 60°C, y la cepa M1B-PB en el rango de temperaturas de 30 a 60°C, lo que sería un indicador que la actividad de la enzima se mantiene estable a esas temperaturas.

Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey Subconjuntos homogéneos para alfa = 0.05

Temperatura	<i>Bacillus spp. M1A-PA</i>		<i>Bacillus spp. M1B-PA</i>			<i>Bacillus spp. M1B-PB</i>	
	1	2	1	2	3	1	2
40°C	4,34933		4,09433			4,84967	
50°C	4,33400		4,13767			4,84967	
60°C	4,26667		4,20800			4,74000	
30°C	4,64467		4,30433			4,84967	
20°C	4,76000		4,47267			5,06000	
Significancia	0,666	0,383	0,092	0,178	1,000	0,084	1,000

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la estabilidad a pH y temperatura de las proteasas producidas por bacterias aisladas de sedimento marino del balneario de Huanchaco, Trujillo, Perú. Se aislaron doce cepas de microorganismos con capacidad proteolítica; de éstas se seleccionaron las

tres cepas que presentaron el mayor halo de hidrólisis de proteínas (Figura 1), las cuales de acuerdo a sus características tintoriales, morfológicas y bioquímicas se identificaron como bacterias del género *Bacillus*. Como se puede apreciar en la Figura 2. Los halos de hidrólisis de proteínas observados, se explican porque las especies del género *Bacillus*, sintetizan y excretan enzimas proteolíticas extracelulares durante sus fases de crecimiento y esporulación (Zaragoza, 2011).

Las bacterias del género *Bacillus*, se caracterizan por su amplia resistencia a los factores ambientales extremos, lo que les permite vivir en diversos ambientes entre los que se encuentran los sedimentos marinos, que son en su mayoría alcalinos. Entre los microorganismos alcalófilos seleccionados y usados en varios procesos industriales, los miembros del género *Bacillus* constituyen una fuente predominante de proteasas alcalinas (Mathew y Gunathilaka, 2015; Sharmila et al., 2012), debido a sus características quimioorganotróficas, a su alta velocidad de crecimiento, a la secreción de enzimas extracelulares en los medios de cultivo y porque son seguras de manipular (Saggu y Mishra, 2017).

La actividad proteolítica de las tres cepas seleccionadas se muestra en la Tabla 1, en donde se puede apreciar que la cepa M1B-PA, es la que presenta el mayor halo de hidrólisis (12 mm), seguida de las cepas M1B-PB (8 mm) y M1A-PA (5 mm). Estos resultados son similares a otros reportados en los que se aislaron 22 cepas de *Bacillus* con actividad proteolítica con un halo de hidrólisis entre 1 a 8 mm; en este caso, estos halos son de menor tamaño que los hallados en la presente investigación en la que se observaron diámetros en el rango de 5 a 12 mm. En todos los casos, el tamaño del halo de hidrólisis depende de la actividad y estabilidad de la enzima.

Al respecto, Bhunia et al. (2013) sostienen que la estabilidad de una enzima se juzga por la actividad residual, mientras la actividad catalítica se define como la capacidad de una enzima para catalizar un proceso. La estabilidad y la actividad se ven afectadas por ciertos parámetros, que pueden ser físicos (temperatura y pH) o químicos (la presencia de inhibidores o activadores, etc.). En la presente investigación, se evaluó la estabilidad de las proteasas estudiadas frente a la temperatura y pH.

En la Tabla 2, se presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad de las enzimas frente a los cambios de pH y se observa que de acuerdo al análisis de ANOVA existe diferencia en la actividad de hidrólisis de proteínas en por lo menos uno de los promedios ($p = 0.00$), lo que se corroboró en la prueba de comparaciones múltiples (Tabla 3), en donde se observa que para la cepa *Bacillus sp.* M1A-PA, no hay diferencia significativa entre la cantidad de proteína hidrolizada a pH 7 y 9 ($P = 0.754$), y que se presenta una hidrólisis mayor que a pH 5. Por otro lado, la cepa *Bacillus sp.* M1B-PA, no muestra estabilidad enzimática, pues la cantidad de proteína hidrolizada disminuye a medida que aumenta el pH, en este caso no hay subconjuntos homogéneos. La cepa *Bacillus* M1B-PB produce la proteasa más estable, pues no hay diferencia significativa entre las cantidades de proteína hidrolizada en los tres valores de pH ($p = 0.803$), por lo que esta bacteria sería una buena candidata para optimizar la producción de enzimas a nivel industrial.

En la Tabla 4, se presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad de las enzimas frente a los cambios de temperatura, y se observa que de acuerdo al análisis de ANOVA existe diferencia en la actividad de hidrólisis de proteínas en por lo menos uno de los promedios ($p = 0.00$), lo que se corroboró en la prueba de comparaciones múltiples (Tabla 5), en donde se observa que para las cepas M1A-PA y M1B-PA no hay diferencia significativa entre la cantidad de proteína hidrolizada en el rango de temperatura que va de 40 a 60°C ($p = 0.666$ y 0.092 respectivamente), lo que indicaría que las enzimas producidas son estables a esas temperaturas; mientras que las de la cepa M1B-PB, tienen estabilidad en el rango de 30 a 60°C ($p = 0.084$). También se observa que no hay diferencia con la cantidad de proteína hidrolizada a 20 y 30°C por la proteasa de *Bacillus sp.* M1A-PA ($p = 0.383$); a 60, 30°C por la proteasa de *Bacillus sp.* M1B-PA ($p = 0.178$). Así mismo, aun cuando a temperaturas menores, la cantidad de proteína hidrolizada es ligeramente menor, lo importante es que las enzimas proteolíticas mantienen su capacidad de hidrólisis a temperaturas mayores. En este caso, la proteasa de la cepa M1B-PB es la que presenta estabilidad a mayor rango de temperatura.

Los resultados obtenidos con la proteasa de *Bacillus* M1B-PB, son similares a los obtenidos por Hammami et al. (2017), quienes evaluaron el perfil de actividad de pH de las proteasas de *B. invictae* a pH entre 6,0 y 13,0, y observaron que la enzima cruda fue altamente activa entre pH 8,0 y 12,0 con un óptimo entre pH 9,0

y 11,0. Las actividades relativas a pH 8,0 y 12,0 fueron aproximadamente 77,73%, and 84,12%, respectivamente. Los perfiles de estabilidad térmica mostraron que la enzima cruda era muy estable a 30 y 40°C (100%), mientras que a 50°C la preparación enzimática retuvo 94%, 92% y 89% de su actividad original después de la incubación durante 60, 120 y 180 min, respectivamente. Después de 6 h de incubación a 30, 40 y 50°C, se observó una ligera inhibición y las actividades enzimáticas restantes fueron $98,29 \pm 1,93\%$, $98,69 \pm 0,28\%$ y $82,02 \pm 3,37\%$ de la inicial, respectivamente. Así mismo, Salem et al. (2016) reportaron que las proteasas de *B. licheniformis* RBS 5 conservaron su actividad inicial completa a 60°C durante 30 minutos de incubación.

Esto puede deberse a que los microorganismos que viven en un ambiente alcalino (agua de mar) poseen una gran capacidad de adaptabilidad, lo que les permite crecer de manera óptima en entornos hostiles como altos niveles de sal, temperatura y presión (Barzkar et al., 2018). Por otro lado, Si et al. (2018) purificaron y caracterizaron una proteasa microbiana producida extracelularmente a partir de *Bacillus subtilis* FBL- 1, y observaron que la proteasa purificada mostró la actividad más alta a 45°C y pH 9,0, y que la actividad permaneció estable en el rango de temperatura de 30 a 50°C y el rango de pH de 7,0 a 9,0.

Los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Zaragoza (2011), quien encontró que a pH 8, la enzima proteolítica presenta una mayor actividad a 40 y 60°C. Algo similar reportaron Mathew y Gunathilaka, (2015), quienes al evaluar una serin proteasa termoestable de *Bacillus licheniformis*, NMS-1, observaron que esta enzima desarrollaba su actividad hidrolítica de manera óptima a pH 9 y temperatura de 60°C. Por otro lado, Ghorbel et al. (2003) estudiaron una proteasa de *Bacillus cereus*, reportando que en presencia de 2 nM de Ca²⁺, la actividad de la proteasa aumenta en un 500% y haciéndola resistente al aumento de temperatura.

Los resultados obtenidos en esta investigación, corroboran lo establecido por Ramesh et al. (2009), quienes indican que la mayoría de las enzimas microbianas extracelulares, son altamente estables a cambios químicos y físicos en el medio, y por esa razón son insumos potenciales para ser empleados a nivel industrial en la elaboración de detergentes, acondicionamiento de cueros, en la industria alimentaria y farmacéutica, así como en la recuperación y solubilización de proteínas orgánicas.

5. CONCLUSIONES

En este estudio, se aislaron tres cepas de bacterias productoras de proteasas a partir de sedimento marino del balneario de Huanchaco, Trujillo, Perú, codificadas como M1A-PA, M1B-PA y M1B-PB, las cuales fueron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus* mediante caracterizaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, no se pudo identificar la especie por lo que fueron denominados como *Bacillus* spp.

Para el ensayo cualitativo de producción de proteasas, estas tres cepas de bacterias se sembraron en agar leche 2%, en donde, *Bacillus* spp M1B-PA fue el que presentó el mayor halo de degradación de proteína (12 mm), seguido de *Bacillus* spp M1B-PB con un halo de 8 mm.

Las proteasas producidas por la cepa de *Bacillus* spp M1B-PB fueron las que presentaron mayor estabilidad, pues conservaron su actividad proteolítica a pH 5, 7, y 9 y en el rango de temperatura de 30 a 60°C. Las proteasas producidas por la cepa *Bacillus* spp M1A-PA son estables a pH 7 y 9 y en el rango de temperatura que va de 40 a 60°C. Las características de estas enzimas, indican que éstas podrían ser adecuadas para utilizarse en la industria de detergentes.

Las proteasas producidas por la cepa *Bacillus* spp M1B-PA no son estables a los cambios de pH, su mayor actividad hidrolítica se da a pH 5, sin embargo, presentan estabilidad a temperaturas que van de 40 a 60°C. Por lo que podrían seguir evaluándose para determinar su potencial uso en la industria.

Es necesario seguir investigando para optimizar la producción de estas enzimas y evaluar su estabilidad frente a otros factores como solventes orgánicos, iones metálicos.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad César Vallejo, que financió el estudio a través del fondo concursable de investigación y al Microbiólogo Luis Cabanillas Chirinos, del Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo por el apoyo brindado durante la ejecución de la investigación.

REFERENCIAS

- Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., Wasim, M. y Awan, A. R. (2020). Optimization of Conditions for the Higher Level Production of Protease: Characterization of Protease from *Geobacillus* SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization* 11(12), 6613–6623.
- Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, R. y Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles* 22(3), 335–346.
- Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R. et al. (2021). Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *Journal of Chemistry*, 2021, 1–17.
- Bhunia, B., Basak, B., Mandal, T., Bhattacharya, P. y Dey, A. (2013). Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70kDa). *Intern. Journal of Biological Macromolecules* 54(1), 1–8.
- Chapman, J., Ismail, A. E. y Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8(6), 20–29.
- Coker, J. A. (2016). Extremophiles and biotechnology: Current uses and prospects. *F1000Research* 5, 1–8.
- Cui, H., Yang, M., Wang, L. y Xian, C. J. (2015). Identification of a new marine bacterial strain SD8 and optimization of its culture conditions for producing alkaline protease. *PLoS ONE* 10(12), 1–13.
- EL-Eskafy, H., Abdel-Hamid, M., Abbas, R., Hamza, H. y El- Zanaty, A. (2016). Production of Thermostable Protease From "*Bacillus amyloliquefaciens*": An Egyptian Marine Isolate. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 7(8), 227–234.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A. y Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology* 32(5), 513–518.
- Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N. y Nasri, M. (2010). Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21. *Biochemical Engineering Journal* 51(1–2), 53–63.
- Hakim, A., Bhuiyan, F., Iqbal, A., Emon, T., Ahmed, J. y Azad, A. (2018). Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon* 4(6), e00646.
- Hammami, A., Hamdi, M., Abdelhedi, O., Jridi, M., Nasri, M. y Bayoudh, A. (2017). Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 272–281.
- Hou, E., Xia, T., Zhang, Z. y Mao, X. (2017). Purification and characterization of an alkaline protease from *Micrococcus* sp. isolated from the South China Sea. *Journal of Ocean University of China* 16(2), 319–325.
- Ibrahim, A. S. S., Al-Salamah, A. A., Elbadawi, Y. B., El-Tayeb, M. A. y Shebl Ibrahim, S. S. (2015). Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology* 18(3), 236–243.
- Jisha, V., B. Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N. Unni, K., Sajith, S., Priji, P., Sarath Josh, M. y Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research* 01(03), 39–51.
- Mathew, C.D. y Gunathilaka, M. . (2015). Production, purification and characterization of a thermostable alkaline serine protease from *Bacillus licheniformis* NMS-1. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research* 6(3), 19–27.
- Mordor intelligence. (2020). Industrial enzymes market - growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2021 - 2026). Recuperado: <https://mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>
- Ramesh, S., Rajesh, M. y Mathivanan, N. (2009). Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32(6), 791–800.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. y Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7(6), 1–20.
- Saggu, S. K. y Mishra, P. C. (2017). Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PLoS ONE* 12(11), 1–18.
- Salem, R. Ben, Abbassi, M. S., Cayol, J.-L., Bourouis, A., Mahrouki, S., Fardeau, M.-L. y Belhadj, O. (2016). Thermophilic *Bacillus licheniformis* RBS 5 isolated from hot tunisian spring co-producing alkaline and thermostable alpha-amylase and protease enzymes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 05(06), 557–562.
- Sharmila, S., Jeyanthi Rebecca, L., Susithra, G., y Dhanalakshmi, V. (2012). Partial Purification of Protease from Seaweed. *International Journal of Applied Biotechnology and Biochemistry* 2(1), 2248–9886.