

## OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES POR *Pseudomonas sp.* M211 EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Luis Alejandro-Paredes<sup>a</sup>, Carol N. Flores-Fernández<sup>a</sup>, Amparo I. Zavaleta<sup>\*a</sup>

### RESUMEN

Las proteasas microbianas representan el grupo más destacado en el mercado mundial de enzimas, ya que tienen diversas aplicaciones industriales. Además, poseen ventajas respecto a las producidas por otras fuentes, tales como ser más estables y ser excretadas al medio de fermentación. El género *Pseudomonas* ha sido reportado como productor de proteasas con potencial industrial. Sin embargo, en la producción intervienen factores como la composición del medio y las condiciones de cultivo, cuya optimización permite reducir costos e incrementar el rendimiento. En este contexto, se determinaron los componentes del medio que influyeron significativamente en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211 en fermentación sumergida. El estudio de un factor a la vez permitió evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en la producción. Los valores más altos se obtuvieron usando las fuentes de carbono: glicerol, maltosa, galactosa o glucosa; las de nitrógeno: peptona, extracto de carne, extracto de levadura o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; y las de iones:  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{KCl}$ . Estos factores fueron seleccionados para elaborar el diseño experimental Plackett-Burman. Los factores se evaluaron en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), y cinco puntos centrales, para lo cual se realizaron 33 experimentos con una réplica. Del análisis, se determinó que los factores extracto de levadura y peptona influyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) en la producción.

**Palabras clave:** Proteasas extracelulares, *Pseudomonas sp.*, Plackett-Burman, fermentación sumergida.

## OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR EXTRACELLULAR PROTEASES PRODUCTION BY *Pseudomonas sp.* IN SUBMERGED FERMENTATION

### ABSTRACT

Microbial proteases are the most important group in the enzymes world market, because have several industrial applications. Moreover, they have some advantages respect to proteases

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002, Lima 1 Perú. e-mail: azavaletap@unmsm.edu.pe

produced by other sources, such as to have more stability and to be excreted to fermentation medium. The genus *Pseudomonas* has been studied as a protease producer of enzymes with industrial potential. Nevertheless, the production is affected by factors such as medium composition and culture conditions, and their optimization lead to reduce costs and increase yield. In this context, medium components that influenced significantly in production of *Pseudomonas sp.* M211 extracellular proteases in submerged fermentation were determined. In this work, one-factor-at-a-time method was used to assess the effect of different carbon, nitrogen and ions sources in proteases production. The highest level of extracellular proteases was obtained in medium containing carbon sources: glycerol, maltose, galactose or glucose; nitrogen sources: peptone, beef extract, yeast extract or  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; and ions:  $\text{CaCl}_2$  or  $\text{KCl}$ . Further, these factors were selected to elaborate Plackett-Burman experimental design. The factors were tested at two levels, high (+1) and low (-1), five center points and 33 trials in duplicate. As a result of Plackett-Burman design analysis, yeast extract and peptone were identified with statistically significant effects ( $p$  value < 0, 05).

**Key words:** Extracellular proteases, *Pseudomonas sp.*, Plackett-Burman, submerged fermentation.

## INTRODUCCIÓN

Las proteasas, principalmente las de origen microbiano, constituyen el grupo más importante de enzimas comerciales, ya que tienen gran variedad de aplicaciones en las industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética, médica, peletera, textil, entre otras. Además, estas enzimas son usadas en la formulación de detergentes y en el manejo de residuos y procesos de biorremediación<sup>1-3</sup>.

Las bacterias presentan mayores ventajas en la producción de proteasas debido a su fácil manipulación a nivel genético y crecimiento rápido en espacios limitados. En este aspecto, especies del género *Bacillus* son las principales productoras de proteasas extracelulares, siendo *Bacillus subtilis* la más usada en los sectores industriales<sup>4</sup>. Sin embargo, *Aeromonas sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* también son productoras de proteasas con potencial biotecnológico<sup>5-7</sup>.

Las especies que conforman el género *Pseudomonas* se caracterizan por presentar gran versatilidad de nichos ecológicos, así como de sustratos. En los últimos años, la búsqueda de nuevas cepas bacterianas aisladas de diversos ambientes es permanente, de igual forma, la optimización de la producción de proteasas para disminuir los costos e incrementar el rendimiento. Así, en cepas de *Pseudomonas* se han descrito proteasas alcalinas termoestables con amplio rango de sustratos, tolerantes a solventes orgánicos, y con altos valores de actividad en amplios rangos de pH y temperatura<sup>1,3</sup>.

Por otro lado, la producción de proteasas extracelulares es influenciada por los componentes del medio de cultivo, tales como las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones. Por ejemplo,

se ha descrito la composición de los medios de cultivo para la producción de proteasas por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>1,4,8,9</sup>.

El estudio de un factor a la vez y el diseño estadístico Plackett-Burman (PB) permiten determinar los componentes del medio de cultivo que influyen significativamente en la producción. A su vez, el diseño PB analiza la interacción entre los factores estudiados a diferentes niveles<sup>10</sup>. Por este motivo, se estudió la influencia de las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211*, asimismo se optimizó su producción mediante el estudio de un factor a la vez y el diseño Plackett-Burman.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Microorganismo

La bacteria M211 fue aislada de muestras de suelos de los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios. Para el aislamiento, las muestras de suelos fueron resuspendidas en NaCl 0,9 %; se hicieron diluciones seriadas en buffer fosfato salino hasta 10<sup>-12</sup>, se sembraron en placas con agar triptosa de soya y se incubaron a 37 °C por 24 h. Las distintas colonias fueron aisladas según sus características morfológicas. Después, las bacterias se sembraron en placas con agar nutritivo suplementado con gelatina, caseína o skim milk (1 % w/v). La actividad proteolítica se observó mediante halos de hidrólisis alrededor de las colonias. El aislado bacteriano con el mayor halo de hidrólisis fue identificado mediante la secuenciación parcial de los genes ribosómicos 16S. Los aislados proteolíticos fueron almacenados con glicerol 20 % a -80 °C, mientras que para su uso rutinario se mantuvieron en agar nutritivo a 4 °C.

### Producción de proteasas

*Pseudomonas sp. M211* se cultivó en medio basal conteniendo en g/L: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5; NaCl 2,5; glucosa 2,5 y extracto de levadura 5,0. El cultivo se incubó a 40 °C por 24 h a 135 rpm, después se centrifugó a 10000 rpm por 15 min. El sobrenadante libre de células fue usado para los ensayos analíticos. Todos los experimentos de producción se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de volumen de trabajo y 10 % de inóculo. La temperatura de producción (40 °C) es diferente a la de aislamiento (37 °C), debido a que en ensayos preliminares (datos no mostrados), se determinó que a 40 °C había una mayor producción de proteasas extracelulares por parte de esta cepa.

### Ensayo de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó según la metodología descrita por Anson con algunas modificaciones usando caseína como sustrato<sup>11,12</sup>. La reacción enzimática consistió de 0,5 mL de caseína 0,5 % (w/v) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 9 a la cual se le añadió 0,5 mL del sobrenadante libre de células de cada medio de cultivo. La mezcla se incubó por 10 min a 40 °C, luego se adicionó ácido tricloroacético (ATC) al 10 % y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Después; se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se mezcló con 0,5 mL de NaOH

1,5 M y 0,5 mL del reactivo de Folin & Ciocalteu 0,5 M. La reacción se incubó a 40 °C por 30 min y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El blanco de reacción consistió de 0,5 mL de caseína 0,5 % en buffer Tris-HCl 50 mM pH 9, la cual fue incubada por 10 min a 40 °C. Luego se le adicionó ATC al 10 % y 0,5 mL del sobrenadante libre de células de cada medio de cultivo. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Posteriormente, se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se mezcló con NaOH y el reactivo de Folin & Ciocalteu siguiendo el mismo procedimiento que el descrito anteriormente para las muestras. La concentración de caseína digerida en el sobrenadante fue determinada a 660 nm mediante una curva de calibración elaborada usando L- tirosina como sustrato y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente, una unidad (U) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de tirosina por min a pH 9 y 40 °C. La actividad específica se expresó en unidades de enzima por miligramo de proteína.

### **Determinación de la concentración de proteínas**

Se utilizó el reactivo de Bradford siguiendo el protocolo para microensayo, usando 20  $\mu$ L del sobrenadante libre de células de cada medio y 180  $\mu$ L del reactivo. El blanco se determinó usando 20  $\mu$ L de agua destilada y la misma cantidad del reactivo usado para las muestras. La absorbancia fue medida a 595 nm y se usó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

### **Estudio de un factor a la vez**

La selección de los factores que ejercen un efecto positivo, de manera independiente, en la producción de proteasas se realizó mediante el estudio de un factor a la vez. Las fuentes de carbono estudiadas fueron: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almidón, lactosa, galactosa, glicerol y celobiosa; las de nitrógeno: extracto de carne, extracto de levadura, urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , peptona y proteosa peptona; y las de iones:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  y  $\text{KCl}$ . En total se analizaron 21 componentes del medio de cultivo de manera independiente. Las concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en el medio basal fueron de 10; 20 y 0,5 g/L, respectivamente.

### **Diseño Plackett - Burman (PB)**

El diseño PB permite determinar los factores que influyen de manera significativa en la producción de proteasas en un sistema multivariable. Para ello, se seleccionaron aquellos que, en el estudio de un factor a la vez, ejercieron un efecto positivo en la producción. Se analizaron 10 factores, entre ellos: glucosa, glicerol, maltosa, galactosa, peptona, extracto de levadura, extracto de carne,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{KCl}$ . Los factores fueron evaluados en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), y cinco puntos centrales (0) (tabla 1). Se realizaron 33 experimentos con una réplica en dos bloques y el orden de los experimentos se hizo de manera aleatoria. Para el análisis se empleó el programa Minitab versión 17.

**Tabla 1.** Factores experimentales evaluados en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211* usando el diseño Plackett-Burman.

| Código   | Factor               | Niveles (g/l) |      |      |
|----------|----------------------|---------------|------|------|
|          |                      | -1            | 0    | +1   |
| $x_1$    | Glucosa              | 1,0           | 7,0  | 13,0 |
| $x_2$    | Glicerol             | 1,0           | 7,0  | 13,0 |
| $x_3$    | Maltosa              | 1,0           | 7,0  | 13,0 |
| $x_4$    | Galactosa            | 1,0           | 7,0  | 13,0 |
| $x_5$    | Peptona              | 2,0           | 10,0 | 18,0 |
| $x_6$    | Extracto de levadura | 2,0           | 10,0 | 18,0 |
| $x_7$    | Extracto de carne    | 2,0           | 10,0 | 18,0 |
| $x_8$    | NH <sub>4</sub> Cl   | 1,0           | 5,0  | 9,0  |
| $x_9$    | CaCl <sub>2</sub>    | 0,2           | 0,5  | 0,8  |
| $x_{10}$ | KCl                  | 0,2           | 0,5  | 0,8  |

El diseño PB se desarrolló de acuerdo al siguiente modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i$$

donde Y representa la respuesta (producción de proteasas),  $\beta_0$  es el intercepto del modelo,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $x_i$  es el nivel del factor independiente y  $k$  es el número de factores involucrados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el promedio de la producción de proteasas para cada ensayo se usó como respuesta. En base al análisis de regresión, se consideraron significativos en la producción de proteasas los factores que mostraron un nivel de confianza > 95 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

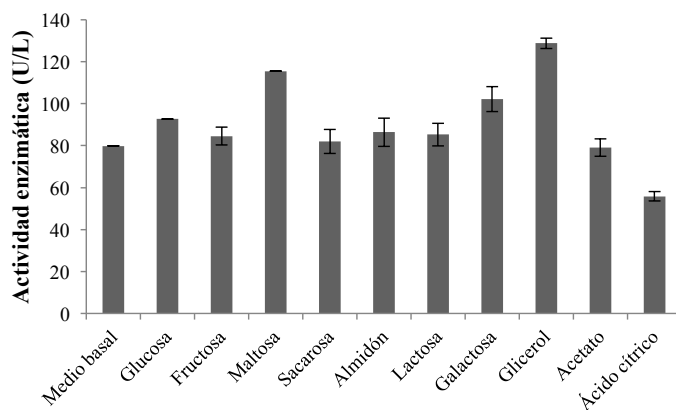
*Pseudomonas sp. M211* fue aislada de muestras de suelos de los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios e identificada mediante el análisis de la secuencia de los genes ribosómicos 16S, presentando un 99 % de similitud con especies del género *Pseudomonas*. Además, esta bacteria presentó halos de hidrólisis de 23,0; 22,2 y 22,3 mm en agares suplementados con gelatina, caseína y skim milk, respectivamente. Los diámetros de los halos de hidrólisis de *Pseudomonas sp M211* fueron superiores a los reportados para otras especies ampliamente conocidas como productores de proteasas comerciales tales como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, entre otras<sup>4</sup>. De este modo, esta cepa bacteriana fue seleccionada para la producción de proteasas en fermentación sumergida.

La producción de proteasas por parte de los microorganismos es influenciada por un conjunto de factores, entre ellos la composición del medio de cultivo. Asimismo, los requerimientos nutricionales en el proceso de fermentación varían según la especie y la cepa<sup>1,13,14</sup>. Por ello, es importante determinar los componentes que afectan significativamente en la producción de enzimas y otros metabolitos para aumentar el rendimiento.

### Estudio de un factor a la vez

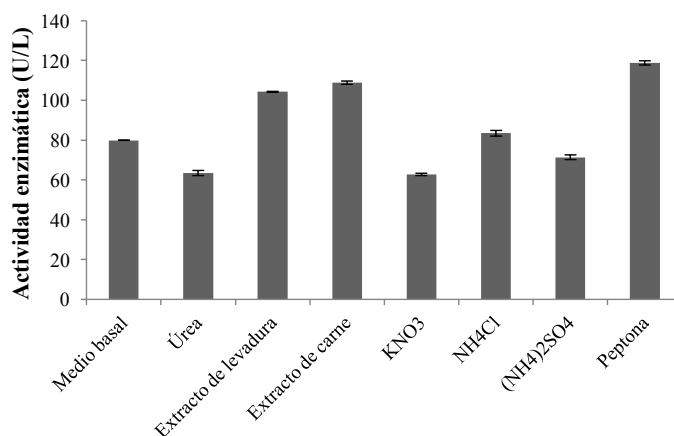
La producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211 se realizó en fermentación sumergida en un medio basal con el cual se obtuvo 79,84 U/L. Este medio fue suplementado con distintas fuentes de carbono, nitrógeno y de iones, las cuales ejercieron diversos efectos en la producción de proteasas por parte de esta bacteria. La influencia de los factores en la producción de forma independiente permite seleccionar aquellos que ejercen un efecto positivo.

En general, las fuentes de carbono son fundamentales para el crecimiento de los microorganismos y por ende para la producción de sus metabolitos. Es así que, al suplementar el medio basal con estas fuentes, los valores más altos de actividad proteolítica fueron obtenidos usando glicerol, maltosa, galactosa y glucosa. El glicerol y la maltosa incrementaron en 61 % y 45 % la producción de proteasas, respectivamente (figura 1). En un estudio similar, Gupta y col<sup>1</sup>, reportaron que el glicerol fue la fuente de carbono más eficiente para la producción de proteasas en *Pseudomonas aeruginosa* Pse. Con respecto a la glucosa, por un lado, algunos estudios indican que disminuye la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* debido a mecanismos de represión catabólica<sup>1,2</sup>. Por otro lado, se reporta que galactosa, glucosa y maltosa incrementan la producción de proteasas en *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*<sup>8,9</sup>.



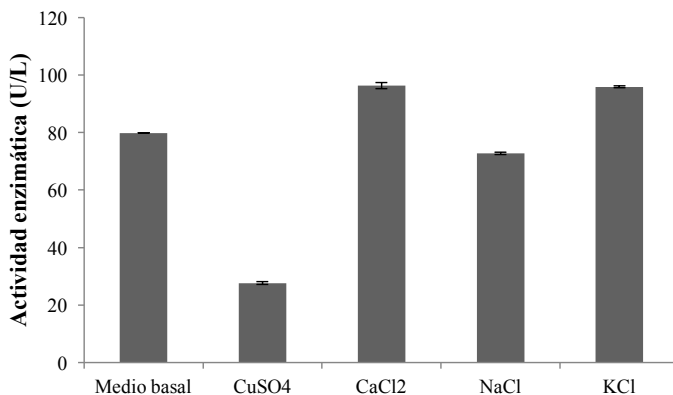
**Figura 1.** Efectos de las fuentes de carbono en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211 por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los microorganismos metabolizan las fuentes de nitrógeno para obtener aminoácidos y proteínas. En este sentido, se ha descrito que las de naturaleza orgánica son más efectivas para la producción de proteasas, sin embargo su utilización varía de cepa a cepa. En este estudio, la peptona, el extracto de carne y el extracto de levadura incrementaron en 49 %, 36 % y 21 % la producción de proteasas, respectivamente (figura 2). Gupta y col<sup>1</sup>, determinaron en *Pseudomonas aeruginosa* PsA que el extracto de levadura, la peptona y el extracto de carne incrementan en 90 %, 52 % y 10 % la producción de proteasas, respectivamente. A la vez, otros autores reportaron a la peptona como la fuente de nitrógeno más eficiente para la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* y *Bacillus subtilis*<sup>2,4</sup>. Sin embargo, Bhagwat y col<sup>2</sup> indican que el extracto de carne disminuye en 60 % la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* SUK. Por otro lado, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  incrementó tan solo en 7 % la producción de proteasas en *Pseudomonas sp. M211*. Estos hallazgos están de acuerdo a los reportados por otros autores quienes indicaron que las fuentes orgánicas son mejor utilizadas por cepas de *Pseudomonas sp.* en la producción de proteasas<sup>1,3,13</sup>.



**Figura 2.** Efectos de las fuentes de nitrógeno en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp. M211* por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los iones metálicos estimulan la producción óptima de proteasas así, el  $\text{CaCl}_2$  y el  $\text{KCl}$  incrementaron la producción en un 20 %, mientras que el  $\text{NaCl}$  la disminuyó en 9 % y el  $\text{CuSO}_4$  la inhibió (figura 3). En estudios previos, se reportó que el  $\text{KCl}$  aumenta la producción en un 39 % y el  $\text{CaCl}_2$  estimula la secreción de proteasas en *Pseudomonas sp.*<sup>15</sup>.



**Figura 3.** Efectos de las fuentes de iones en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211 por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

### Diseño Plackett-Burman (PB)

Los factores que en el estudio de un factor a la vez ejercieron un efecto positivo en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211, fueron seleccionados para elaborar la matriz del diseño PB. La matriz del diseño experimental con los 10 factores seleccionados ( $x_1$ - $x_{10}$ ) y la respuesta (actividad enzimática) se muestran en la tabla 2. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente (actividad observada) variaron de 173 a 450 U/L, según los niveles de los factores empleados en cada corrida del experimento (tabla 2). Además, podemos notar que estos son cercanos a los calculados (actividad calculada) por el modelo.



**Tabla 2.** Matriz del diseño Plackett-Burman mostrando la actividad de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp. M211*.

| Corrida | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> | X <sub>8</sub> | X <sub>9</sub> | X <sub>10</sub> | Actividad enzimática* (U/L) |           |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------------------|-----------|
|         |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                 | Observada                   | Calculada |
| 1       | -1             | 1              | -1             | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | -1              | 192                         | 233       |
| 2       | 1              | 1              | -1             | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | -1             | -1              | 263                         | 298       |
| 3       | -1             | -1             | 1              | 1              | -1             | -1             | 1              | -1             | -1             | -1              | 269                         | 277       |
| 4       | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1              | 173                         | 251       |
| 5       | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | -1             | 1              | 1              | 1               | 243                         | 310       |
| 6       | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | -1             | 1               | 291                         | 326       |
| 7       | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 1               | 276                         | 316       |
| 8       | -1             | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | 1               | 339                         | 313       |
| 9       | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1              | 256                         | 283       |
| 10      | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | -1              | 450                         | 336       |
| 11      | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | -1             | 1              | 1              | -1              | 329                         | 293       |
| 12      | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1               | 377                         | 323       |
| 13      | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 409                         | 334       |
| 14      | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 361                         | 315       |
| 15      | 1              | -1             | -1             | 1              | -1             | -1             | -1             | -1             | 1              | 1               | 350                         | 307       |
| 16      | 1              | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | -1              | 339                         | 335       |
| 17      | -1             | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | -1             | 1               | 339                         | 322       |
| 18      | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | 1               | 362                         | 331       |
| 19      | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | -1              | 277                         | 281       |
| 20      | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1               | 405                         | 337       |
| 21      | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | -1              | 338                         | 315       |
| 22      | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | -1             | -1             | -1              | 254                         | 250       |
| 23      | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | 1               | 229                         | 272       |
| 24      | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 266                         | 315       |
| 25      | -1             | -1             | -1             | -1             | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | -1              | 309                         | 335       |
| 26      | -1             | -1             | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | 1               | 300                         | 324       |
| 27      | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 275                         | 315       |
| 28      | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | 1              | -1             | 1               | 269                         | 299       |
| 29      | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | -1             | 1              | -1              | 297                         | 277       |
| 30      | 1              | 1              | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1               | 351                         | 315       |
| 31      | 1              | -1             | -1             | -1             | -1             | 1              | 1              | -1             | -1             | 1               | 346                         | 315       |
| 32      | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 282                         | 323       |
| 33      | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | -1              | 248                         | 286       |

\*Los valores de actividad son el promedio de los duplicados.

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño PB presentado en la tabla 3 indica que el extracto de levadura ( $x_6$ ) y la peptona ( $x_5$ ) son los factores que influyen significativamente en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211 ( $p < 0,05$ ). Estos valores coinciden con los reportados por otros autores en estudios similares, quienes describen que de los componentes del medio de fermentación, las fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura y la peptona influyen significativamente en la producción de proteasas por cepas de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*<sup>2,4,10</sup>.

**Tabla 3.** ANOVA de los factores del diseño Plackett-Burman en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211.

| Factores                | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de cuadrados | F     | p      |
|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|-------|--------|
| <b>Modelo</b>           | 83046             | 12                 | 6920,5                | 2,22  | *0,024 |
| <b>Glucosa</b>          | 961               | 1                  | 961,1                 | 0,31  | 0,581  |
| <b>Glicerol</b>         | 114               | 1                  | 114,3                 | 0,04  | 0,849  |
| <b>Maltosa</b>          | 330               | 1                  | 330,3                 | 0,11  | 0,746  |
| <b>Galactosa</b>        | 2138              | 1                  | 2137,8                | 0,69  | 0,411  |
| <b>Peptona</b>          | 18433             | 1                  | 18433,1               | 5,92  | *0,018 |
| <b>Extr. levadura</b>   | 42791             | 1                  | 42791,1               | 13,75 | *0,001 |
| <b>Extr. carne</b>      | 1875              | 1                  | 1874,6                | 0,60  | 0,441  |
| <b>NH<sub>4</sub>Cl</b> | 6174              | 1                  | 6174,0                | 1,98  | 0,165  |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | 224               | 1                  | 224,0                 | 0,07  | 0,790  |
| <b>KCl</b>              | 8355              | 1                  | 8354,6                | 2,68  | 0,107  |

\*Valores significativos

La ecuación polinomial de primer orden, mostrada a continuación, explica la producción de proteasas según el análisis de regresión múltiple de los datos:

$$Y=199,7+0,69 x_1+0,24 x_2+0,40 x_3-1,03 x_4+2,27 x_5+3,46 x_6+0,72 x_7+2,62 x_8+6,7 x_9+40,7 x_{10} \text{ ----- (Eq. 1)}$$

De acuerdo a los coeficientes de esta ecuación, se observa que todos los factores ejercen un efecto positivo en la producción de proteasas, excepto la galactosa ( $x_4$ ). Por lo tanto, considerando la significancia de los factores y su efecto en la producción, la ecuación final del modelo sería:

$$Y=199,7+2,27 x_5+3,46 x_6 \text{ ----- (Eq. 2)}$$

En este sentido, el diseño PB permitió determinar que de los 10 factores analizados, sólo dos influyeron significativamente en la producción, lo cual permitió incrementar la producción y reducir el número de factores en estudio.

A partir de la ecuación lineal obtenida del diseño PB (Eq. 2), se podría maximizar la respuesta siguiendo la ruta del ascenso más pronunciada. Esta ruta empezaría desde el punto central del diseño PB; y la variación de los factores  $x_5$  y  $x_6$  estaría en función a los coeficientes de la Eq. 2. El diseño de la ruta del ascenso más pronunciada se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño experimental para la ruta del ascenso más pronunciada en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211*

| Pasos                                | Variables codificadas |       | Variables naturales |                      |
|--------------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|----------------------|
|                                      | $x_5$                 | $x_6$ | Peptona             | Extracto de levadura |
| <b>Origen</b>                        | 0                     | 0     | 10                  | 10                   |
| <b>Paso</b>                          | 0,66                  | 1     | 1,3                 | 2                    |
| <b>Origen + <math>\Delta</math></b>  | 0,66                  | 1     | 11,3                | 12                   |
| <b>Origen + 2<math>\Delta</math></b> | 1,32                  | 2     | 12,6                | 14                   |
| <b>Origen + 3<math>\Delta</math></b> | 1,98                  | 3     | 13,9                | 16                   |
| <b>Origen + 4<math>\Delta</math></b> | 2,64                  | 4     | 15,2                | 18                   |
| <b>Origen + 5<math>\Delta</math></b> | 3,30                  | 5     | 16,5                | 20                   |

Finalmente, se podría pasar al modelo de superficie de respuesta (RSM), un modelo de segundo orden, con el cual se podrían determinar los valores óptimos de  $x_5$  y  $x_6$  en los que Y tenga su valor máximo. El diseño podría ser un diseño de compuesto central (DCC) de 28 experimentos con una réplica, cuya matriz se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Matriz del diseño de compuesto central para la producción de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211.

| Corrida | $x_5$   | $x_6$   |
|---------|---------|---------|
| 1       | -1      | 1       |
| 2       | 0       | 0       |
| 3       | 0       | 0       |
| 4       | 0       | 0       |
| 5       | 1       | 1       |
| 6       | -1      | -1      |
| 7       | 1       | -1      |
| 8       | 1       | -1      |
| 9       | 0       | 0       |
| 10      | -1      | 1       |
| 11      | -1      | -1      |
| 12      | 1       | 1       |
| 13      | 0       | 0       |
| 14      | 0       | 0       |
| 15      | 0       | -1,4142 |
| 16      | 0       | 0       |
| 17      | 0       | 0       |
| 18      | -1,4142 | 0       |
| 19      | 0       | 1,4142  |
| 20      | 1,4142  | 0       |
| 21      | 0       | 0       |
| 22      | 0       | 0       |
| 23      | 0       | 0       |
| 24      | 0       | 0       |
| 25      | -1,4142 | 0       |
| 26      | 0       | 1,4142  |
| 27      | 1,4142  | 0       |
| 28      | 0       | -1,4142 |

## CONCLUSIONES

El estudio de un factor a la vez permitió seleccionar las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones que tienen un efecto positivo en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211. Es así que, de los 21 componentes del medio estudiados inicialmente, de manera independiente, se seleccionaron 10 para el diseño Plackett-Burman. Los factores encontrados significativos con este diseño fueron el extracto de levadura y la peptona. Estos resultados indican que las fuentes de nitrógeno influyen de manera significativa en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por CIENCIACTIVA, según Convenio N° 007- FONDECYT-2014.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta A, Khare SK. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 42(1):11-16.
2. Bhagwat PK, Jhample SB, Dandge PB. Statistical medium optimization for the production of collagenolytic protease by *Pseudomonas sp.* SUK using response surface methodology. *Microbiology.* 2015; 84(4):520–530.
3. Patil U, Chaudhari A. Optimal production of alkaline protease from solvent-tolerant alkalophilic *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926. *Indian J Biotechnol.* 2011; 10(3):329–339.
4. Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J Taibah Univ Sci.* 2015; 9 (1):50–55.
5. Divakar K, Priya JDA, Gautam P. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *J Mol Catal B Enzym.* 2010; 66 (3–4):311–318.
6. Romero FJ, García LA, Salas JA, Díaz M, Quirós LM. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochem.* 2001; 36(6):507–515.
7. Kanchana R, Jadhav S, Goletikar Y, Manerekar G. Production of Alkaliphilic Protease(s) by *Enterobacter sp* for Application in Biodetergent Formulation. *Ind Biotechnol.* 2012; 8(1):31–35.
8. Nadeem M, Qazi JI, Baig S, Syed Q. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technol Biotechnol.* 2008; 46(4):388–394.
9. Suganthi C, Mageswari A, Karthikeyan S, Anbalagan M, Sivakumar A, Gothandam KM. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *J Genet Eng Biotechnol.* 2013; 11(1):47–52.
10. Rajendran A, Thirugnanam M, Thangavelu V. Statistical evaluation of medium components by Plackett–Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian J Biotechnol.* 2007; 6:469–478.
11. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol.* 1938; 22: 79- 89.
12. Folin O, Ciocalteu V. Enzymatic assay of protease using casein as a substrate. *J Biol Chem.* 1929; 73: 627-650.

13. Reddy LVA, Wee YJ, Yun JS, Ryu HW. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour Technol.* 2008; 99(7):2242–2249.
14. Boopathy NR, Indhuja D, Srinivasan K, Uthirappan M, Gupta R, Ramudu KN, et al. Statistical medium optimization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10501, its characterization and application in leather processing. *Indian J Exp Biol.* 2013; 51(4):336–342.
15. Rahman RNZA, Geok LP, Basri M, Salleh AB. An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. Nutritional factors affecting protease production. *Enzyme Microb Technol.* 2005; 36:749–757.