
INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 GÉNERO <i>BACILLUS</i>	1
1.1.1 Características culturales, morfológicas y fisiológicas.....	1
1.1.2 Endoespora y esporulación	2
1.1.3 Requerimientos nutricionales y vías metabólicas.....	3
1.1.4 Patogenicidad	4
1.1.5 Estudios taxonómicos	5
1.2 PRODUCTOS PRODUCIDOS POR <i>BACILLUS</i>	6
1.2.1 Enzimas.....	7
1.2.2 Insecticidas.....	7
1.2.3 Antibióticos	8
1.2.4 Biodegradación de macromoléculas	8
1.2.5 Otros productos.....	8
1.2.6 Productos producidos por <i>Bacillus</i> manipulados genéticamente	9
1.3 PROTEASAS.....	9
1.3.1 Función	11
1.3.2 Regulación metabólica de su síntesis	13
1.3.2.1 Represión catabólica	14
1.3.2.2 Inducción por sustrato	15
1.3.2.3 Inhibición por producto final	15
1.4 PRODUCCIÓN DE PROTEASAS.....	16
1.4.1 Producción comercial y aplicación	16
1.4.2 Manipulación de la regulación metabólica	17
1.4.3 Producción de proteasas por cultivo sumergido.....	19

Indice

1.4.3.1 Cultivo por lote.....	19
1.4.3.1.1 Cinética del cultivo por lote	22
1.4.3.2 Cultivo por lote alimentado.....	24
1.5 OBJETIVOS.....	27
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 MATERIALES.....	28
2.2 CONSERVACIÓN DE LA CEPA.....	28
2.3 IDENTIFICACIÓN.....	29
2.3.1 Observación macroscópica de las colonias.....	29
2.3.2 Observación microscópica del cultivo.....	29
2.3.3 Prueba de movilidad.....	30
2.3.4 Crecimiento anaerobio	30
2.3.5 Crecimiento a pH 5.7.....	30
2.3.6 Crecimiento a pH 6.8.....	31
2.3.7 Crecimiento a distintas concentraciones (2-10 %) de cloruro de sodio.....	31
2.3.8 Temperatura máxima y mínima de crecimiento.....	31
2.3.9 Ensayo de sensibilidad a la penicilina G.....	31
2.3.10 Producción de catalasa.....	32
2.3.11 Prueba del rojo metilo (RM)/Voges Proskauer (VP).....	32
2.3.12 Producción de ácidos y gas a partir de diferentes sustratos.....	33
2.3.13 Degradación de caseína.....	33
2.3.14 Degradación de gelatina.....	34
2.3.15 Degradación de almidón	34
2.3.16 Reacción sobre agar-sangre	34
2.3.17 Utilización de citrato.....	35
2.3.18 Descomposición de la L-tirosina	35
2.3.19 Desaminación de DL-fenilalanina	36
2.3.20 Reducción del nitrato.....	36
2.3.21 Producción de indol.....	36
2.3.22 Sistema API 50 CH	37
2.4 ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS DEL <i>BACILLUS</i> SP IIQDB 32.....	37

Indice

2.4.1 Estudio de diferentes nutrientes en cultivos por lotes a nivel de matraces agitados.....	37
2.4.1.1 Medios de cultivo	38
2.4.1.2 Condiciones de cultivo	42
2.4.1.3 Obtención y preparación de muestras	42
2.4.2 Estudio de la influencia de la glucosa, la peptona y del caldo nutritivo como fuentes de carbono y nitrógeno a nivel de biorreactor de laboratorio	43
2.4.2.1 Medios de cultivo	43
2.4.2.2. Condiciones de cultivo	44
2.4.2.3 Obtención y preparación de muestras	45
2.4.3 Técnicas analíticas	45
2.4.3.1 Determinación de la concentración de biomasa por método espectrofotométrico.....	45
2.4.3.2 Determinación de actividad proteolítica.....	46
2.4.3.2.1 Método de la azocaseína	46
2.4.3.2.2 Actividad coagulante.....	46
2.4.3.2.3 Método de la caseína.....	47
2.4.3.2.4 Determinación de la actividad depilante sobre pieles ovinas.....	48
2.4.3.3 Determinación de proteínas.....	50
2.4.3.3.1 Método con azul de Coomassie.....	50
2.4.3.3.2 Método de Lowry	51
2.4.3.4 Determinación de glucosa por método enzimático	51
2.5 ESTUDIOS ENZIMÁTICOS	52
2.5.1 Concentración de la actividad proteolítica por ultrafiltración	52
2.5.2 Caracterización de los principales componentes proteicos del extracto crudo	53
3.- RESULTADOS	55
3.1. IDENTIFICACIÓN.....	55
3.1.1 Características morfológicas del <i>Bacillus</i> sp. IIQDB32 y de sus colonias.....	55
3.1.2 Características culturales y bioquímicas del <i>Bacillus</i> sp. IIQDB 32.....	59
3.1.3 Tratamiento de los resultados.....	60
3.2 ESTUDIOS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS DEL <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IIQDB 32	62
3.2.1 Determinación de la viabilidad de los cultivos.....	62

Índice

3.2.2 Medidas utilizadas para evaluar la producción de proteasas.....	63
3.2.3 Estudio de diferentes nutrientes en cultivos por lotes a nivel de matraces.....	64
3.2.3.1 Seguimiento microbiológico del cultivo.....	78
3.2.3.2 Mecanismos regulatorios que intervienen en la actividad proteolítica producida.....	78
3.2.4 Estudio de la influencia de la glucosa, la peptona y del caldo nutritivo como fuentes de carbono y nitrógeno a nivel de biorreactor de laboratorio.....	80
3.2.4.1 Cultivos por lotes.....	80
3.2.4.1.1 Seguimiento microbiológico del cultivo.....	85
3.2.4.1.2 Mecanismos regulatorios que intervienen en la actividad proteolítica producida.....	86
3.2.4.2 Cultivos por lotes alimentados.....	89
3.2.4.2.1 Seguimiento microbiológico del cultivo.....	93
3.2.4.2.2 Mecanismos regulatorios que intervienen en la actividad proteolítica producida.....	94
3.3 ESTUDIOS ENZIMÁTICOS.....	95
3.3.1 Concentración de la actividad proteolítica por ultrafiltración.....	95
3.3.2 Caracterización de las principales fracciones proteicas presentes en el extracto crudo.....	96
3.3.2.1 Peso Molecular.....	96
3.3.2.1.1 Corridas en condiciones desnaturalizantes.....	96
3.3.2.1.2 Corridas en condiciones no desnaturalizantes.....	96
3.3.2.2 Actividad proteolítica.....	98
3.3.2.3 Efecto del pH en el patrón de bandas con actividad proteolítica.....	99
3.3.2.4 Efecto de diferentes compuestos químicos en la actividad de las proteasas.....	100

Indice

4.- CONCLUSIONES.....	108
5.-ABREVIATURAS.....	110
6.-NOMENCLATURA.....	112
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	114
ANEXO I.....	137