

---

## RESUMEN

---

La industria del cuero se encuentra entre las seis industrias más importantes del país por su nivel ocupacional, incidencia en el PBI nacional y su capacidad exportadora. El volumen de efluentes producidos por el sector se estima en 2:960.000 m<sup>3</sup> por año y se caracteriza por su elevada carga orgánica e importante nivel de toxicidad debido a su contenido en sulfuro y cromo. En el Departamento de Bioingeniería se ha desarrollado un proceso de depilado enzimático de pieles ovinas (con extensión futura a pieles bovinas) que permite disminuir la carga orgánica y tóxica de estos efluentes al recuperar el pelo y eliminar el uso de sulfuros en los baños de depilado. El objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento de tres aspectos de este proceso: I) el microorganismo, II) las enzimas presentes en el extracto depilante y III) el proceso de su producción.

La cepa seleccionada como buena productora de enzimas depilantes se identificó como perteneciente a la especie *B. subtilis* según estudios morfológicos, culturales y fisiológicos realizados.

Se estudió la incidencia en la producción de proteasas de los componentes del medio de cultivo: caldo nutritivo, peptona, triptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, NH<sub>4</sub>Cl, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que el caldo nutritivo es un medio apropiado para sustentar el crecimiento y la producción de proteasas de este *Bacillus*, que la actividad proteolítica producida aumentó con la adición al medio de cultivo de extracto de levadura (3 g/l), glucosa (5 g/l), Ca<sup>2+</sup> (3 mM), Mn<sup>2+</sup> (0.8 mM) y disminuyó con NH<sub>4</sub>Cl (4 g/l) y Fe<sup>2+</sup> (0.1 mM), que la actividad del extracto crudo producido se mantiene al suplantar el caldo nutritivo por dos de sus componentes la triptona y el extracto de carne.

En la búsqueda de un medio de cultivo económico que permita su utilización a nivel industrial, se logró una producción de proteasas del orden de la obtenida con caldo nutritivo en un medio que contiene peptona y glucosa en cultivo por lote alimentado donde la concentración de glucosa en el medio de cultivo varió entre ~ 0-2.5g/l.

Del estudio de los mecanismos regulatorios que intervienen en la producción de proteasas se vió que: I) la síntesis de parte o el total de las proteasas es inducible y esta sujeta a represión catabólica por glucosa; II) la producción de proteasas sigue una cinética de formación de producto mixta; III) las enzimas contenidas en el extracto crudo están involucradas en por lo menos dos procesos, proteasas ligadas a la hidrólisis de fuentes de carbono y nitrógeno complejas y proteasas vinculadas a la esporulación.

Mediante SDS-PAGE y electroforesis de actividad se caracterizaron las proteasas presentes en el extracto crudo, 1 serino proteasa y 3 proteasas cuyas características se asimilan a las metalo proteasas. El PM relativo de las metalo proteasas es de 151, 106 y 39 kDa, su rango de actividad se extiende entre pH 5 y 10 y su actividad se vió inhibida parcialmente con PMSF y totalmente con EDTA. La serino proteasa tiene un PM relativo de 80 kDa, su rango de actividad se limita a pH 7-8, se inhibe parcialmente con pCMB y totalmente con PMSF y EDTA y su actividad depende del ion Ca<sup>2+</sup>.