

EXPRESIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES EN EL CULTIVO DE ALTA DENSIDAD DEL MICROORGANISMO CON ACTIVIDAD BIONEMATICIDA *Tsukamurella paurometabola*, C924

Nemecio González, Idania Wong, Eulogio Pimentel, Jesús Zamora, Eladio Salazar, Jesús Mena

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey

*En el presente trabajo se determinó la etapa de mayor expresión de las proteasas extracelulares de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C924, agente activo del bionemático HeberNem. El estudio se realizó en un cultivo de alta densidad, ajustando los datos experimentales a modelos de crecimiento diauxico combinado con el de Luedekin Piret de formación de producto. Durante la etapa de crecimiento en amino ácidos libres no se detectó la expresión de proteasas al medio de cultivo. La expresión de las proteasas se fue incrementando en la segunda mitad de la fase de crecimiento en sacarosa. Estos resultados demuestran que el microorganismo excreta las proteasas en ausencia de amino ácidos libres debido a la necesidad de hidrolizar otras proteínas excretadas y las derivadas del debris celular en la fase avanzada del cultivo de alta densidad. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo mixto de formación de producto. Estos resultados permitirán maximizar la producción de las proteasas con el objetivo de aumentar la actividad biológica del bionemático HeberNem.*

Palabras clave: proteasa extracelular, bionemático, cultivo de alta densidad, *Tsukamurella paurometabola*.

*In the present study we determined the stage for greater expression of the extracellular proteases of the bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C924, the active agent bionemático HeberNem. The study was conducted in a crop of high-density, adjusting the experimental data to model diauxico combined with the growth of Luedekin Piret training product. During the phase of growth in free amino acids were not detected the expression of proteases to the culture medium. The expression of proteases was increased in the second half of the growth phase in sucrose. These results demonstrate that the microorganism excreted proteases in the absence of free amino acids because of the need to hydrolyze other proteins and excreted from the cellular debris in the advanced stage of the cultivation of high density. The data was adjusted to a mixed model of product training. These results allow maximizing the production of proteases with the aim of increasing the biological activity of bionemático HeberNem.*

Key words: extracellular protease, bionemático, cultivation of high-density, *Tsukamurella paurometabola*.

Introducción

En el control de nemátodos los microorganismos han demostrado tener una elevada eficacia y para ello tienen diferentes mecanismos de acción /1-4/. Dentro de los principales mecanismos que emplean algunas bacterias para controlar nemátodos está la secreción de enzimas que interfieren en el crecimiento de los nemátodos /4-7/.

Mena y colaboradores /8/ demostraron que la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, agente biológico activo del bionemático

HeberNem® expresa enzimas quitinolíticas, las cuales actúan sobre la cutícula de los nemátodos causando la muerte de los mismos.

Se demostró que varias proteasas microbianas están envueltas en el proceso de infección contra nemátodos, dentro de ellas las proteasas de bacterias hematófagas tales como *Br. laterosporus*, cepa G4, *Bacillus sp.* cepa B16, RH219 y de otras cepas de *Bacillus* /7, 9, 10/. Estudios recientes reportan que la bacteria *Tsukamurella paurometabola* expresa enzimas proteolíticas, las cuales pueden interferir también en el crecimiento y

la reproducción de los nemátodos. Además, estas enzimas pueden tener usos industriales como se ha reportado en la literatura /11/, por lo que maximizar la expresión de las mismas puede conllevar a aumentar la actividad nematocida del HeberNem, así como a abrir nuevos horizontes de acción al producto.

El uso de modelos matemáticos ha sido una herramienta eficaz para aumentar la expresión de proteínas extracelulares /12, 13 y 14/. En el presente trabajo se ajustó la expresión de las enzimas proteolíticas secretadas por el microorganismo *Tsukamurella paurometabola* a un modelo matemático con el objetivo de evaluar en qué etapa del crecimiento se expresan dichas enzimas. El modelo obtenido sirve de base para maximizar la expresión de estas enzimas en futuros trabajos.

Materiales y métodos

Microorganismo. Se empleó el microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, aislado del suelo.

Condiciones de cultivo. Se empleó el medio de cultivo SD, que tiene como fuentes de carbono extracto de levadura y sacarosa /24/. El cultivo se realizó en fermentadores de tres litros (B.E. Marubishi). La temperatura de cultivo fue de 36 °C, y el pH se controló a 6,6.

Técnicas analíticas. La concentración celular se determinó por peso seco en balanza de peso seco Sartorius MD30A. La concentración de oxígeno se determinó con la ayuda de un sensor polarográfico de oxígeno disuelto (Ingold). La concentración de sacarosa se determinó por el método Fenol sulfúrico /15/ y los aminoácidos del extracto de levadura presente en el medio de cultivo, por método colorimétrico empleando el reactivo de ninhidrina /16/.

La actividad enzimática se determinó según el método reportado por García-Carreño /17/ utilizando azocaseína al 1% como sustrato. Una unidad de actividad enzimática (UAE) equivale a una unidad de absorbancia a 450 nm por mL de extracto enzimático por minuto de reacción. Se calculó la expresión de las proteínas totales em-

pleando el método descrito por Bradford /18/. Se realizó una cimografía de las enzimas excretadas a diferentes tiempos de fermentación, utilizando un gel de poliacrilamida al 12,5 % de acrilamida y 0,1 % de gelatina, según describe Aponte y colaboradores /19/. Estas muestras también fueron aplicadas en gel de SDS-PAGE con 12,5 % de acrilamida, para separar las proteínas y determinar su concentración por densitometría.

Modelación matemática. Para describir el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo mixto (aminoácidos y sacarosa) se empleó un modelo matemático que refleja un crecimiento diauxico, descrito por Lee y colaboradores /20/ y para modelar la expresión de las enzimas se empleó el modelo descrito por Luedeking y Piret /21/ con una modificación asociada a la inhibición de la expresión de las enzimas en presencia de aminoácidos. Las ecuaciones del modelo propuesto se muestran a continuación:

Velocidad de formación de células

$$rX = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\mu = \mu_A + \mu_S$$

$$\mu_A = \mu_{A_{max}} \frac{C_A}{K_A + C_A}$$

$$\mu_S = \mu_{S_{max}} \frac{C_S}{(K_S + C_S) \cdot (K_I + C_A)}$$

Velocidad de consumo de sustratos

$$rA = \frac{dC_A}{dt} = -a_A \cdot \mu_A \cdot X - m_A \cdot X - aP_A \cdot rP$$

$$rS = \frac{dC_S}{dt} = -a_S \cdot \mu_S \cdot X - m_S \cdot X - aP_S \cdot rP$$

Velocidad de formación de enzimas

$$rP = \frac{dP}{dt} = (\alpha \cdot rX + \beta \cdot X) \left(\frac{C_{A_0} - C_A}{C_{A_0}} \right)$$

El sistema de ecuaciones diferenciales se integró empleando el método Runge Kuta de orden cuatro.

Resultados y discusión

Crecimiento microbiano

En la figura 1 se muestra la cinética de crecimiento celular y consumo de sustratos ajustados al modelo de crecimiento diauxico. El modelo se ajustó a los datos experimentales con un coeficiente de regresión de $R^2 = 0,99$.

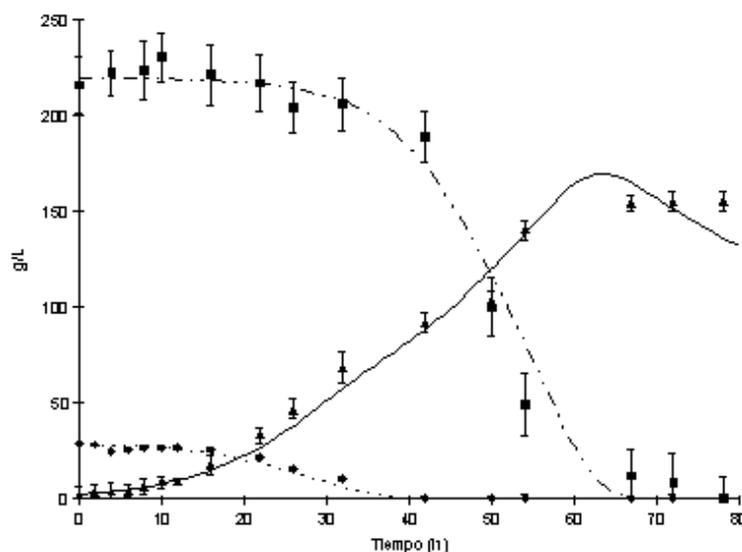


Fig. 1 Cinéticas de formación de células y consumo de sustrato. Valores experimentales: ◆ - Concentración de aminoácidos, ■ - Concentración de sacarosa, ▲ - Concentración de biomasa seca. Valores del modelo: - - - - - Concentración de aminoácidos, - · - · - Concentración de sacarosa y — - - - - Concentración de biomasa seca.

Podemos apreciar el consumo consecutivo de los sustratos, evidenciándose la afinidad del microorganismo por los aminoácidos. Un comportamiento similar se reportó para el creci-

miento de *Penicillium camembertii* /22/ y *Brevibacterium linens* /23/. Los parámetros cinéticos del modelo ajustado se muestran en la tabla 1.

Tabla 1
Parámetros cinéticos del modelo diauxico ajustado

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$\mu_{A_{diaux.}}$, [h ⁻¹]	0,25 ± 0,04	α_A , [g g ⁻¹]	0,40 ± 0,11
K_A , [g/L]	37,01 ± 0,36	α_S , [g g ⁻¹]	1,30 ± 0,04
$\mu_{S_{diaux.}}$, [h ⁻¹]	0,30 ± 0,03	m_A , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,006 3 ± 0,000 7
K_S , [g/L]	21,39 ± 8,96	m_S , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,002 1 ± 0,001 4
K_I , [g/L]	7,02 ± 0,39	α , [g g ⁻¹]	0,003 ± 0,001
αP_A , [g g ⁻¹]	0,10 ± 0,05	β , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,000 34 ± 0,000 11
αP_S , [g g ⁻¹]	0,011 ± 0,006		

Los parámetros cinéticos muestran que las velocidades de crecimiento máximas son similares en los dos sustratos, y que la conversión biomasa sustrato es inferior para el crecimiento en sacarosa. El valor del coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento es diez veces superior al no asociado, lo que indica que la expresión de las enzimas proteolíticas es fundamentalmente para el crecimiento del microorganismo.

Expresión de las enzimas proteolíticas

En la figura 2 se muestra la cinética de formación de las enzimas proteolíticas, así como el ajuste del modelo propuesto. Se puede apreciar que la expresión de las mismas ocurre en la etapa de crecimiento en sacarosa. Este resultado indica que las enzimas son secretadas por el microorganismo cuando se agotan los nutrientes aminoacídicos en el medio de cultivo.

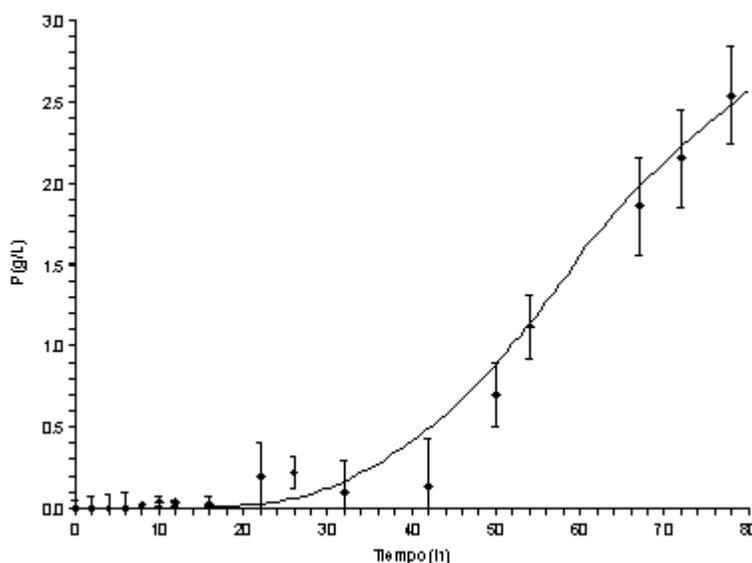


Fig. 2 Cinética de formación de enzimas proteolíticas. • - Valores experimentales, $\frac{3}{4}$ - Valores obtenidos por el modelo ajustado.

Con la acción de estas enzimas proteolíticas el microorganismo puede degradar otras proteínas extracelulares o residuos de células muertas con el objetivo de obtener aminoácidos libres para un crecimiento celular más eficiente.

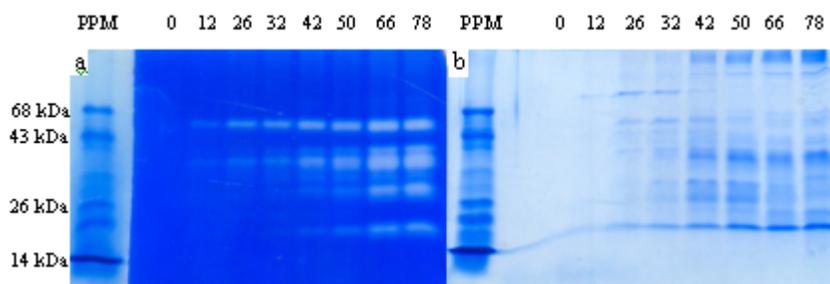


Fig. 3 Cimograma de las muestras del sobrenadante del cultivo a diferentes tiempos de fermentación (en horas) en SDS-PAGE al 12,5 % de acrilamida y 1 % de gelatina (a) y SDS-PAGE al 12,5 % de acrilamida. (b). PPM- representa el Patrón de Peso Molecular.

En la figura 3 se representan las proteínas excretadas durante el proceso fermentativo, a diferentes intervalos desde el inicio hasta la etapa final de agotamiento del microorganismo.

En la figura 3a se pueden apreciar que el microorganismo *Tsukamurella paurometabola* excreta al medio de cultivo una serie de proteínas con actividad proteolítica en un rango de peso molecular comprendido entre 14 y 68 kDa. Se detectó la expresión de estas proteasas a partir de las 12 horas de cultivo, pero se puede apreciar que a partir de las 40 horas de cultivo la expresión de las mismas aumenta. Este resultado coincide con el tiempo de agotamiento de los aminoácidos libres en el medio de cultivo, como se puede apreciar en la figura 1.

Como se puede observar en las figuras 1 y 2, la mayor expresión de las proteasas ocurre durante la etapa del crecimiento en sacarosa. Este hecho muestra que la expresión de las enzimas responde a una necesidad nutricional del microorganismo, ya que las emplea para la degradación de otras proteínas presentes en el medio de cultivo con el objetivo de obtener aminoácidos libres. En la electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 3 b)

se observa una banda por encima de los 68 kDa que comienza a acumularse hasta las 32 h, y posteriormente desaparece, hecho que pudo ser una consecuencia del incremento de la actividad proteolítica a partir de ese momento y que coincide con el agotamiento de los aminoácidos libres.

En la figura 4a se puede apreciar que al final del cultivo el microorganismo ha secretado doce grupos de proteínas de diferentes pesos moleculares, pero de ellos solamente siete presentan actividad proteolítica como se aprecia en la figura 4b.

En la literatura se describen una serie de proteasas extracelulares denominadas BLG4, las cuales están involucradas en los procesos de infección contra nemátodos. /7, 9/. Niu y col. /10/ y Tian y col. /4, 9/ demostraron que la secuencia aminoacídica de las proteasas excretadas por las bacterias entomófagas *Br. laterosporus*, cepa G4, *Bacillus sp.*, cepas B16 y RH219 y otras cepas de *Bacillus*, tienen una elevada homología (97-99 %). La elevada identidad de la secuencia aminoacídica de las proteasas de diferentes cepas de bacterias nematófagas sugiere que estas proteasas son altamente conservadas en este grupo de bacterias.

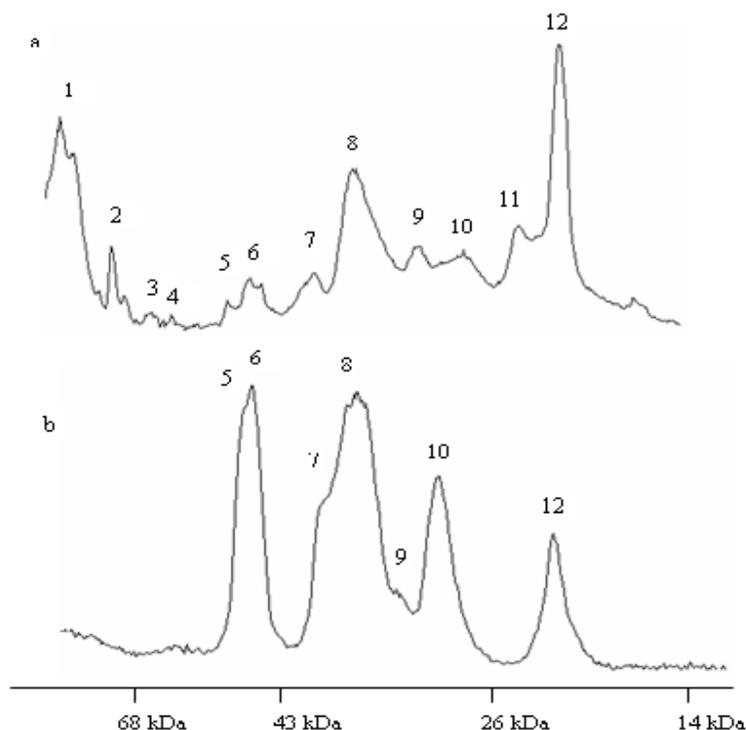


Fig. 4 Densitometría de los geles de electroforesis de proteínas totales (a) y del cimograma (b) para la muestra de las 78 horas de cultivo.

En la tabla 2 se muestran los valores de actividad enzimática específica para cada grupo de proteínas, calculada a partir de las densitometrías realizadas a las electroforesis. Se puede apreciar que la mayor actividad específica corresponde a

las fracciones de proteínas 5 y 6, las cuales se encuentran entre 43 y 60 kDa de peso molecular. Es de destacar también la actividad presentada por las fracciones 7 y 10, no obstante encontrarse en bajas concentraciones.

Tabla 2
Actividad enzimática específica de los grupos de proteasas detectados

No Pico	Talla Aproximada (kDa)	Actividad enzimática específica UAE
5 y 6	43 – 60	7,452
7	40 – 42	4,482
8	35 – 40	1,643
9	30 – 35	0,826
10	26 – 30	4,700
12	20 – 25	0,665

Conclusiones

El crecimiento de *Tsukamurella paurometabola* C924 en el medio mixto SD en cultivo de alta densidad experimenta una diauxia de crecimiento. La expresión de las proteasas al medio de cultivo ocurre cuando el microorganismo crece en sacarosa como fuente de carbono. Empleando el modelo de crecimiento se demostró que la cinética de expresión de las proteasas es mixta, mientras el microorganismo crece en sacarosa. En las condiciones de fermentación presentadas en este trabajo, se alcanza un crecimiento celular de 150 gramos de peso por litro de cultivo y un máximo de expresión de proteasas de 2,5 gramos por litro de cultivo. El microorganismo excreta proteasas de diferentes pesos moleculares, siendo las que se encuentran entre 43 y 60 kDa las de mayor actividad específica.

Nomenclatura

μ Velocidad específica de crecimiento celular (h^{-1})
 μ_A Velocidad específica de crecimiento celular en aminoácidos (h^{-1})
 μ_s Velocidad específica de crecimiento celular en sacarosa (h^{-1})
 X Concentración celular ($g L^{-1}$)

μ_{Amax} Velocidad específica de crecimiento máximo en aminoácidos (h^{-1})
 μ_{smax} Velocidad específica de crecimiento máximo en sacarosa (h^{-1})
 C_A Concentración de aminoácidos ($g L^{-1}$)
 C_s Concentración de sacarosa ($g L^{-1}$)
 P Concentración de enzimas ($g L^{-1}$)
 K_s Parámetro cinético asociado al crecimiento en sacarosa ($g L^{-1}$)
 K_A Parámetro cinético asociado al crecimiento en aminoácidos ($g L^{-1}$)
 K_I Constante de inhibición ($g L^{-1}$)
 a_A Coeficiente de conversión de aminoácidos en biomasa ($g g^{-1}$)
 a_s Coeficiente de conversión de sacarosa en biomasa ($g g^{-1}$)
 m_A Constante de mantenimiento celular en aminoácidos (h^{-1})
 m_s Constante de mantenimiento celular en sacarosa (h^{-1})
 t Tiempo (h)
 rX Velocidad global de crecimiento celular ($g L^{-1} h^{-1}$)
 rA Velocidad global de consumo de aminoácidos ($g L^{-1} h^{-1}$)
 rS Velocidad global de consumo de sacarosa ($g L^{-1} h^{-1}$)
 rP Velocidad global de formación de enzimas ($g L^{-1} h^{-1}$)

- α Coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento (h)
- β Coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento (-)
- C_{AO} Concentración inicial de aminoácidos ($g L^{-1}$)
- UAE** Unidades de actividad enzimática
- SDS-PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

Bibliografía

1. Emmert, E.A.B y Handelsman, J. "Biocontrol of plant disease: a (Gram +) positive perspective", en *FEMS Microbiol. Lett.* vol. 171, 1999, págs. 1-9.
2. Siddiqui, Z.A y Mahmood, I. "Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review", en *Bioresource Techbol*, vol. 69, 1999, págs. 167-179.
3. Meyer, S.L.F. "United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service research programs on microbes for management of plant-parasitic nematodes", en *Pest Manag Sci.* vol. 59, 2003, págs. 665-670.
4. Tian, B.; Yang, J. y Zhang, K.Q. "Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: population, mechanisms of action and future prospect", en *FEMS Microbiol Ecol.* vol. 61, 2007, págs. 197-213.
5. Cox, G.N.; Kusch, M. y Edgar, R.S. "Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization" en *J Cell Biol*, vol. 90, 1981, págs 7-17.
6. Decraemer, W.; Karanastasi, E.; Brown, D. y Backeljau, T. "Review of the ultrastructure of the nematode body cuticle and its phylogentic interpretation", en *Biol Rev*, vol. 78, 2003, págs. 465-510.
7. Huang, X.W.; Tian, B.Y.; Niu, Q.H.; Yang, J.K., Zhang, L.M. y Zhang, K.Q. "An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes", en *Res Microbiol*, vol. 156, 2005, págs. 719-727.
8. Mena, J.; Pimentel, E.; Hernández, A. T.; Veloz, L.; Vázquez, R. P.; León, L.; Mencho, J. D.; Ramírez, Y.; Pujol, M., y Borroto, C. "Mechanism of action of *Corynebacterium paurometabolum* strain C-924 on nematodes", en *Nematology*, vol. 4, núm. 2, 2002, pág. 287.
9. Tian, B.Y.; Li, N.; Lian, L.H.; Liu, J.W.; Yang, J.K. y Zhang, K.Q. "Cloning, expression and deletion of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4", en *Arch Microbiol*, vol. 186, 2006, págs. 297-305.
10. Niu, Q.H.; Huang, X.W., Tian, B.Y., Yang, J.K.; Liu, J., Zhang, L. y Zhang, K.Q. "Bacillus sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor", en *Appl Microbiol Biotechnol*, vol 69, 2005, págs. 722-730.
11. Luna Guido, M.L.; Jarquin, C.Vega y cols. "Actividad microbiana en suelos ", en *Avance y Perspectiva*, vol.21, 2002, págs. 328-332.
12. Monteagudo, J.M.; Rodriguez, L. y Rincon, J. "Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses" en *Chem. Technol. Biotechnol*, vol. 68, núm. 3, 1997, págs. 271-276.
13. Berry, A.R.; Franco, C.M.M. y Zhang, W. "Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium", en *Biotechnol. Lett.* vol. 21, núm. 2, 1999, págs. 163-167.
14. Oyaas, J.; Storro, I. y Levine, D.W. "Uptake of lactose and continuous lactic acid fermentation by entrapped non-growing *Lactobacillus helveticus* in whey permeate", en *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 46, núm. 3, 1996, págs. 240-249.
15. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. y Smith, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", en *Anal Chem*, vol. 28, 1956, págs. 350-356.
6. Moore, S. "Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction", en *J. Biol. Chem.* vol. 243, 1968, págs. 6281 - 6283.
17. García-Carreño, F. L. y Norman F. H. "Characterization of proteinase clases in Langostilla and crayfish extracts ", en *Journal of Food Biochemistry*, vol 17, 1993, págs 97-113.
18. Bradford, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" en *Anal Biochem.* vol. 72, 1976, págs. 248-254.
19. Aponte, D. M., Gutiérrez, O. Y cols. "Detección de Metaloproteinasa en cáncer gástrico y tejido normal mediante cimografía" en *Rev. Colombiana de Gastroenterol.* Vol. 15, 2000, págs 170-175.
20. Lee, I.; Fredrickson, A. y Tsuchiya, M. "Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*", en

-
- Applied Microbiology , vol. 28, núm. 5, 1975, págs. 831 – 835.
21. Luedeking, R., y Piret, E.L. “A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH”, en J. Biochem. Microbiol. Tech. Engr. vol.1, 1959, pág. 393.
22. Adour, L.; Aziza, M.; Couriol, C. y Amrane, A. “Amino acids as carbon, energy and nitrogen sources for *Penicillium camembertii*”, en J. Chem Technol Biotechnol, vol. 81, 2006, págs. 573 – 579.
23. Boyaval, P.; Moreira, E. y Desmazeaud, M.J. “Transport of aromatic amino acids by *Brevibacterium linens*”, en Journal of Bacteriology, vol. 155, núm. 3, 1983, págs. 1123-1129.
24. Hernández, A., Weekers, F., Mena, J., Borroto, C., and Thonart, P. “Freeze-drying of the biocontrol agent *Tsukamurella paurometabola* C-924. Predicted stability of formulated powders”. Industrial Biotechnology, vol. 2, 2006, no. 3, págs. 209-212.