

Efecto de la aflatoxina B1 sobre el crecimiento y actividad proteolítica de una cepa nativa de *Bacillus* sp

Effect of aflatoxin B1 on growth and enzymatic activity of a native strain of *Bacillus* sp

Alex Sáez Vega*, Olga Montoya**, Edna Judith Márquez***

RESUMEN

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de aflatoxina B₁ (AFAB₁) sobre el crecimiento y actividad enzimática de proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico cultivada en LAM (Licor Agotado de Maíz). Se encontró que la cepa inhibe su crecimiento y actividad enzimática a 1 ppm, lo que demuestra una alta sensibilidad de la cepa evaluada a la AFAB₁, e imposibilita utilizar fácilmente medios obtenidos de maíz nacional contaminado con esta micotoxina. Las concentraciones inferiores a 0.1 ppm no tienen ningún efecto sobre el crecimiento y la actividad enzimática.

Palabras clave: *Bacillus*, aflatoxina, proteasas alcalinas.

ABSTRACT

The effect of different aflatoxin B₁ (AFAB₁) concentrations on alkaline protease growth and enzymatic activity was evaluated; a native strain of alkalophilic *Bacillus* sp cultivated in CSL (Corn Steep Liquor) was used. It was found that the effect of AFAB₁ on the strain inhibited its growth and enzymatic activity to 1 ppm, showing that the strain is highly sensible to AFAB₁, meaning that medium obtained from Colombian corn contaminated with this mycotoxin cannot be easily used. Concentrations less than 0.1 ppm did not affect growth and enzymatic activity.

Key words: *Bacillus*, aflatoxin, alkaline proteases.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son endopeptidasas que actúan sobre las proteínas hidrolizando enlaces peptídicos, éstas pueden ser metaloproteasas que trabajan a pH óptimo de 7.0; esterasas, enzimas con alta actividad esterolítica y baja actividad proteolítica, y serinoproteasas (proteasas alcalinas), que tienen residuo serina en/o cerca al sitio activo. Desde 1967 se conoce que las cepas de *Bacillus* que crecen a pH por encima de 10 sintetizan enzimas extracelulares que presentan alta actividad proteolítica, son activas y estables a pH hasta 12, o temperaturas relativamente altas y poseen puntos isoelectrónicos extremada-

mente básicos, estabilizadas por el ion Ca²⁺ (Pérez *et al.*, 1987; Simoncini, 1987). Estas proteasas se utilizan como aditivos para jabones y detergentes, así como en diversas industrias como la tenería y los textiles, entre otros, y se ha evaluado su producción en diferentes medios de desecho (Fujiwara y Yamamoto, 1987). Este trabajo está dirigido a evaluar una cepa de *Bacillus* que ha mostrado gran potencial en la producción de este tipo de enzimas.

Uno de los sustratos de bajo costo que podría utilizarse en nuestro país para producir proteasas es el maíz de desecho, generalmente contaminado con aflatoxinas producidas por mohos que crecen en el

* Químico, M. Sc. en Biotecnología. Profesor, Escuela de Ingeniería. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. Correo electrónico: asaez@eafit.edu.co

** Bacterióloga, M. Sc. Bacteriología. Profesora, Laboratorio de Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.

*** Bióloga, M. Sc. Biología. Profesora, Escuela de Biología Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.

Recibido: septiembre 2 de 2003. **Aceptado:** marzo 2 de 2004.

grano almacenado. En Antioquia se han reportado niveles superiores a 500 ppb de AFAB₁, pero por acumularse principalmente en el pericarpio se elimina hasta un 95% en el trillado (Pabón *et al.*, 1986). Desafortunadamente, las aflatoxinas son altamente genotóxicas para el hombre, animales y algunos microorganismos entre los que se han reportado cepas de *Bacillus* deficientes en recombinación (Uraguchi y Yamazaki, 1978).

La cepa a evaluar, el *Bacillus* 5A7.1, presentó gran actividad enzimática en LAM mostrando su mejor actividad a pH 8.5, 1.5% de LAM, y peptona a relación molar C/N = 1.5. (Sáez *et al.*, 2003). Estas mismas condiciones se toman con el fin de evaluar el efecto de la aflatoxina B₁ (AFAB₁), que es la micotoxina más importante, sobre la actividad enzimática de proteasas alcalinas secretadas por la cepa nativa de *Bacillus* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. Se utilizó la cepa nativa 5A7.1 de *Bacillus* sp Alcalofílico, aislada por Montoya (1997) en suelo con pH 8.6.

Adaptación de la cepa a pH 8.5. La cepa liofilizada se inocula en LB a pH 7.0 en un volumen de 10 mL con agitación a 200 rpm, 12 h, a 30 °C. Se inocula luego con un 10% de inóculo en medio LAM a pH 7.0, se repite la operación a las mismas condiciones, inoculando finalmente en LAM de pH 8.5.

Efecto de la AFAB₁ sobre el crecimiento y la actividad enzimática en LAM. El efecto de la AFAB₁ sobre el crecimiento y la actividad enzimática para el experimento se evaluó a 1.5% de LAM (Corn Steep Liquor. ®Sigma C 4648), pH de 8.5 y peptona con relación molar C/N = 1.5, dado que son condiciones que presentan buena actividad enzimática y de crecimiento (Sáez *et al.*, 2003). La aflatoxina B₁ (®Sigma A 6636) se utilizó en concentraciones 1, 10, 100 y 1000 ppb. Se tomó como control un cultivo no tratado con AFAB₁. El medio comercial se diluye a 1.5% con agua desionizada, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 min a 15 psi.

Para la cinética de crecimiento se realizaron los tratamientos por triplicado y se tomaron muestras a tiempos entre 0 y 36 h, a intervalos aproximados de 2 h. El crecimiento celular se cuantificó a λ 400 nm (Montoya, 1997). La agitación se realizó en un agitador horizontal a 200 rpm y a temperatura constante de 30 °C.

La actividad enzimática de cada tratamiento se determinó a las 30 h, centrifugando a 4 °C, 5000 rpm durante 30 minutos y usando el sobrenadante de la fermentación mediante el método de Delft (Van Velzen, 1976; Montoya, 1997), la actividad se da en unidades Delft por gramo de proteína medida por el método de Lowry (ADU/g) (Montoya, 1997; Lowry *et al.*, 1951).

Las diferencias entre los tratamientos, teniendo en cuenta las comparaciones entre las variables respuestas, fueron estimadas mediante análisis de varianza con un $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la AFAB₁ sobre el crecimiento

En la figura 1 se observa que la concentración de la aflatoxina es una variable importante en el crecimiento de la cepa del *Bacillus* Alcalofílico 5A7.1. La inhibición a 1000 ppb es notoria con respecto a las otras concentraciones, a pesar de presentar la mayor variabilidad. Esto lo corrobora el análisis de varianza, dado que el valor Fo = 15,2851 es mayor que el F crítico = 2,5130.

Estos resultados indican que el nivel de 1000 ppb (1.0 ppm) es una concentración inhibitoria del crecimiento, sugiriendo que esta cepa es bastante sensible a la AFAB₁, si se comparan los resultados reportados por Goldblatt (1969), quien encontró para algunas cepas de *Bacillus* y otros microorganismos Gram positivos una concentración mínima inhibitoria por encima de 100 ppm.

Una observación importante es que no se presenta inhibición de crecimiento a concentraciones entre 1, 10 y 100 ppb, la cepa no es sensible a concentraciones menores de 100 ppb, lo que está sustentado por el análisis de varianza donde el valor Fo = 0,088703 es menor que el valor Fc = 2,782599. También se puede afirmar que la concentración del metanol (medio donde se conserva la AFAB₁ estándar a 100 ppm) no interfiere en los resultados, es decir, el solvente de mantenimiento de la AFAB₁ no afecta el crecimiento de la bacteria (concentración máxima de metanol en el medio = 0.1%), esto se observa en que no existen diferencias en cuanto al crecimiento en el control y las tres primeras concentraciones utilizadas.

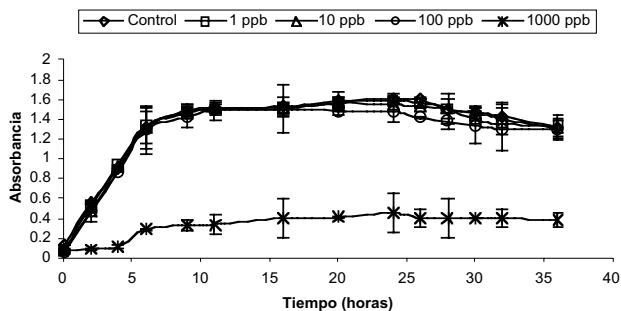


Figura 1. Efecto de la aflatoxina B₁ sobre el crecimiento de la cepa.

Si se tiene en cuenta que a pesar de ser altos, los niveles promedios de AFAB₁ del maíz colombiano no exceden 0.5 ppm, según Pabón y Molina (1986). En el trillado se retira hasta un 90% de la aflatoxina, por lo que es posible usar este maíz en la elaboración de un medio de cultivo propicio para la producción de proteasas alcalinas, dado que en promedio, luego de la detoxificación, el maíz quedaría con un nivel de 0.05 ppm, en donde la bacteria no es sensible. Quedaría pendiente evaluar si la detoxificación previa del maíz mediante trillado incrementa los costos de producción del medio de cultivo (Pabón y Molina, 1986).

Efecto de la AFAB₁ sobre la actividad enzimática

Los resultados observados en la figura 2 indican que la concentración de AFAB₁ es una variable importante en la actividad enzimática y sugieren que al incrementar la concentración de AFAB₁ hasta 1000 ppb se presenta inhibición de la actividad enzimática, concordante con la inhibición del crecimiento observada en la figura 1.

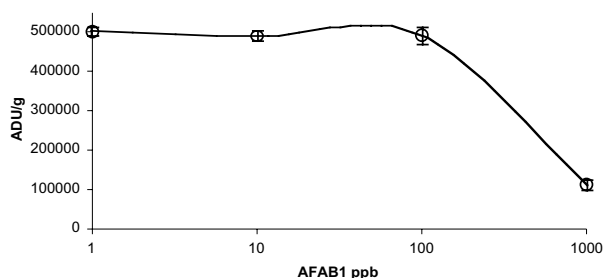


Figura 2. Efecto de la aflatoxina B₁ sobre la actividad enzimática (eje X en escala logarítmica).

Como se observa en la figura 2, La actividad enzimática no se afecta por valores menores de 100 ppb, hecho que es corroborado por el análisis de

varianza de los resultados, donde comparando sólo los valores de AFAB₁ de 1, 10, 100 ppb y el control, no existen diferencias significativas, dado que el estadístico $F_0 = 0,98179248$ es mucho menor que el F crítico = 4,06618028.

CONCLUSIONES

La cepa de *Bacillus* sp 5A7.1 es muy sensible a la presencia de AFAB₁ en el medio de cultivo, debido a que su crecimiento se inhibe a concentraciones de 1000 ppb, valor mucho menor a los reportados como inhibitorios por Goldblatt.

La actividad enzimática de proteasas alcalinas de la cepa de *Bacillus* sp es afectada por la presencia de AFAB₁ en el medio de cultivo a concentraciones mayores o iguales a 1000 ppb, lo que indica que en la elaboración de un medio de cultivo a partir de maíz nacional, se debe mantener la concentración de AFAB₁ por debajo de 100 ppb.

Comparando las diferentes concentraciones evaluadas, que no afectan de manera significativa la actividad (aproximadamente 500000 ADU/g), con la actividad enzimática de la Subtilisina comercial CARLSBER® (523700 ADU/g) reportada por Sáez *et al.*, (2003), puede verse que el maíz previamente tratado mediante trillado podría ser una alternativa que conviene explorar desde el punto de vista técnico-económico.

BIBLIOGRAFÍA

- Fujiwara, N.; Yamamoto, K. 1987. Production of alkaline protease in a low-cost medium bAlkalophilic Bacillus sp. *J. Ferment. Technol.* 63 (3):346.
- Goldblatt, Leo. 1969. Aflatoxins (Serie: Food science and Technology). New york: Academic Press.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol, reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Montoya, O. 1997. Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus* sp. Alcalofílicas y obtención de proteasas alcalinas. Universidad Nacional de Colombia. Tesis. Santa Fe de Bogotá.
- Pabón, G.; Molina, B. E. 1986. Aflatoxinas en maíz. Informe técnico. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
- Pérez, D. *et al.* 1987. Ciencias biológicas. 17. Cuba.
- Sáez, A.; Márquez, E.; Montoya, O. 2003. Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp alcalofílico. *Revista de Ingeniería Química Española*, marzo (399):134-140.
- Simoncini, A. 1987. Subtilinasas production. *J. of American Leather Chemistry Association.* (82).
- Uraguchi, K.; Yamazaki, M. 1978. *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycology.* Japón: John Wiley & Son.
- Van Velzen, A. 1976. Determination of alkaline protease activity. *US Patent.* 1,353,317.