



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**

Trabajo de Graduación

“Selección de cepa de *Bacillus Spp* probiótica autóctona con mayor actividad enzimática”

AUTORES:

Br. Ivette del Carmen Guevara Suárez

Br. Nick Jasón Xavier Guido Saldaña

ASESORES:

Omar Navarro Reyes MV

Elda Alejandra González Ing

Raúl Piad Barreras PhD

Managua, Nicaragua

Abril, 2017



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**

Tema:

“Selección de cepa de *Bacillus Spp* probiótica autóctona con mayor actividad enzimática”

Trabajo de graduación presentado como requisito para optar al título de Médico Veterinario en el grado de licenciatura.

Por:

Br. Ivette del Carmen Guevara Suárez

Br. Nick Jasón Xavier Guido Saldaña

INDICE DE CONTENIDOS

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS	2
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3.1. Ubicación del área de estudio	3
3.2. Materiales utilizados	3
3.2.1. Materiales.....	3
3.2.2. Equipos	3
3.2.3. Reactivos y medios de cultivo	3
3.2. Duración del estudio	4
3.3. Analisis estadístico	4
3.4. Fase de laboratorio.....	4
3.4.1. Reactivación y preparación de solución madre	4
3.4.2. Preparación de medio de cultivo modificados.....	4
3.4.3. Determinación de Unidades de Anson.....	4
3.4.3. Determinación de proteolisis de caseína.....	5
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1. Halos de hidrólisis de caseína.....	6
4.2. Actividad enzimática	6
4.3. Determinación de un medio modificado industrial.....	7
V. CONCLUSIONES.....	10
VI. RECOMENDACIONES	11
VII. LITERATURA CITADA.....	12
VIII. ANEXOS.....	15

DEDICATORIA

A: Dedico mi trabajo investigativo primeramente a Dios por darme la vida y sus infinitas bendiciones.

A: Mi Madre Bertha Saldaña por su esfuerzo, dedicación, por su incondicional apoyo que me ha dado en el transcurso de mi vida y formación académica.

A: Mis Maestros por tener la paciencia, dedicación, voluntad y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y elaboración de la presente tesis.

A: Miurell Fernández por ser mi pilar de fuerza y motivación en mis estudios y mi vida.

Nick Jasón Xavier Guido Saldaña

DEDICATORIA

A: Principalmente a Dios por todas las grandes e infinitas bendiciones que me regala cada día a pesar de tantas tormentas que pasamos en la vida.

A: Mi padre Humberto José Guevara Gómez (Q.E.P.D) por su esfuerzo, dedicación y gran amor que me brindo siempre y por el cual soy la persona de hoy en día.

A: Mis hermanos Martha Guevara y Pedro Guevara por creer en mí y su apoyo incondicional.

A: Esa persona (K.V.B) que ha estado conmigo en los buenos y malos momentos y merece lo mejor de mí.

Ivette del Carmen Guevara Suárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque nos permitió culminar la carrera y por todas las infinitas bendiciones que nos regala cada día de nuestras vidas.

A nuestros padres por todo el apoyo incondicional que nos han brindado siempre en todos los aspectos de la vida.

A nuestros asesores Dr. Omar Navarro, Ing. Elda González, Dr. Raúl Piad por darnos la oportunidad de trabajar nuestro proyecto con ellos.

Al Sr. Manuel Gómez por ayudarnos y apoyarnos con la parte estadística del estudio.

Y a todas las personas que directa o indirectamente nos apoyaron y ayudaron a la culminación de nuestra carrera y nuestro trabajo presente.

Nick Jasón Xavier Guido Saldaña

Ivette del Carmen Guevara Suárez

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Resultados de hidrólisis de caseína	6
2. Composición de medios modificados de las corridas	8

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Resultados de la determinación de Unidades Anson	6
2. Resultados de la determinación de un medio industrial.....	7

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Solución Madre de cepas candidatas	15
2. Reactivación de cepas	15
3. Materiales utilizados en la preparación de diluciones seriadas	15
4. Preparación de medios modificados	15
5. Medios modificados preparados	15
6. Inoculación en medios modificados.....	15
7. Incubación en agitador orbital	15
8. Preparación de sustrato caseína	15
9. Ajuste de Ph del sustrato caseína.....	16
10. Curva patron de tirosina.....	16
11. Reactivos para determinacion de Unidades de Anson.....	16
12. Muestras listas para lectura.....	16
13. Lectura de actividad enzimatica.....	16
14. Realización de diluciones seriadas.....	16
15. Siembra en Agar leche.....	16
16. Halos de hidrólisis de caseína.....	16
17. Identificación molecular de los Microorganismos.....	17
18. Arbol filogenico de los Microorganismos	17

Guevara Suárez, Ivette; Guido Saldaña, Nick; 2017. “Selección de cepa de *Bacillus Spp* probiótica autóctona con mayor actividad enzimática”. Tesis para optar al título de Médico Veterinario el grado de Licenciatura. Managua, Nicaragua. Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA)

RESUMEN

El presente estudio se enfocó en la determinación de actividad enzimática de cepas de *Bacillus spp* autóctonas (X5CD⁻⁹, X5C⁻⁹, X2⁻¹⁰) previamente estudiadas, estas cepas fueron procesadas mediante técnicas de laboratorio para esto se realizaron pruebas probióticas de halos de hidrólisis, unidades de Anson, a si como también la determinación de un medio de cultivo industrial económico y efectivo para la optima reproducción y producción de enzimas proteolíticas de los microorganismos candidatos, en donde resulto como mayor productora de enzimas proteolíticas con 17.5336 UA y 30 mm de halo de hidrólisis, fue la cepa X2⁻¹⁰ que corresponde a un *Bacillus cereus* según su secuenciación, con la composición de la corrida #3 (Melaza: 75 g/l, Levadura torula: 50 g/l, Calcio: 1.5 g/l, Temperatura: 39°C.) la cual fue evaluada atreves del método estadístico coeficiente de variación, presentando el porcentaje más bajo de las 3 cepas candidatas estudiadas.

Palabras clave: Enzimas, Unidades Anson, Bacillus spp, Nativa, Medios de cultivo.

ABSTRACT

The present research focused on the determination of enzymatic activity of native strains of *Bacillus spp* (X5CD⁻⁹, X5C⁻⁹, X2⁻¹⁰) previously studied, these strains were processed by laboratory techniques, probiotic tests were performed such as hydrolysis halos, Anson units, as well as the determination of an economic and effective industrial culture medium for the optimal reproduction and production of proteolytic enzymes of the candidate microorganisms, where it resulted as the largest producer of proteolytic enzymes with 17.5336 AU and 30 mm hydrolysis halos, It was X2⁻¹⁰ strain corresponding to a *Bacillus cereus* according to its sequencing, with the composition of Run # 3 (Molasses: 75 g /l, Torula Yeast: 50 g /l, Calcium: 1.5 g /l, Temperature: 39 °C), which was evaluated through the statistical method coefficient of variability, presenting the lowest percentage of the 3 candidate strains studied.

Keywords: Enzymes, Anson Units, Bacillus spp, Native, Culture medium.

I. INTRODUCCIÓN

Los propios microorganismos pueden servir de alimento tanto para las personas como para los animales; pueden utilizarse para preparar nutrientes especiales, como por ejemplo ácidos orgánicos, sustancias para aumentar el sabor y vitaminas para añadir a los alimentos o pueden servir como fuentes de mezclas de enzimas o de enzimas simples para tratar alimentos durante su elaboración (Frazier et al, 2003).

Las enzimas no solo hacen una contribución esencial en las actividades celulares sino que también encuentran múltiples aplicaciones en la biotecnología, especialmente en la industria de transformación de alimentos (Lee, 1996). Son muy eficientes para acelerar la transformación de sustratos a productos finales (Smith, 2004).

Estas han sido implementadas en la industria desde hace muchos años. En la actualidad, se estima que el 75% de las enzimas de uso industrial se producen por vía microbiana, mientras el otro 25% corresponde a amilasas de cereales germinados, renina para queso y proteasas de origen vegetal (Hernandez et al, 2003).

El hombre conoce unas 2,000 enzimas y ya han sido clasificadas. Se estima que existen más de 25,000 enzimas en la naturaleza. Por lo tanto, se puede ver el grado del potencial de aplicación de las enzimas (Scragg, 2004).

Debido a la poca investigación científica que existe en Nicaragua y a la falta de laboratorios enfocados a elaborar este tipo de productos, todos los probióticos utilizados en las granjas de Nicaragua son importados, como resultado los precios son elevados y los pequeños o medianos productores no tienen los recursos necesarios para hacer uso de ellos (Gonzales & Piad, 2011).

En este estudio se realizó una investigación a escala de laboratorio con el fin de diseñar una tecnología para la obtención de un cultivo a base de *Bacillus spp* y poder realizar la evaluación de su actividad enzimática. Las bases de esta investigación, permitirán proyectar la tecnología diseñada a escala piloto e industrial para que este producto pueda ser comercializado.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Determinar la actividad enzimática de cepas de *Bacillus spp* probióticas autóctonas para su futuro empleo en la industria de producción animal.

2.2. Objetivos Específicos

- Analizar in vitro la actividad enzimática de cepas *Bacillus spp* autóctonas.
- Determinar un medio de cultivo industrial para las cepas de *Bacillus spp* autóctonas productoras de enzimas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área de estudio

El estudio fue realizado en el municipio de Managua el cual limita al Norte con el Lago Xolotlán, al Sur con Municipio de El Crucero, al Este Municipio de Tipitapa, Nindirí y Ticuantepe y al Oeste Municipio Villa Carlos Fonseca y Ciudad Sandino.

Posee una superficie municipal de 289 km² y una superficie del área urbana de 150.5 km². Se encuentra a una altitud mínima de 43 metros sobre el nivel del mar, posee un clima tropical de sabana, caracterizado por una prolongada estación seca y por temperaturas altas todo el año, que van desde los 27° C a 34° C. El promedio de precipitaciones anual se encuentra entre los 1,100 y 1,600 mm con una humedad relativa del 70.5%.

La preparación de caldos puros, optimización del medio modificado y su respectiva cinética de crecimiento fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal-FACA de la Universidad Nacional Agraria-UNA y la determinación de actividad enzimática y determinación de proteólisis de caseína fueron realizados en el Centro Biotecnológico-CEBIOT de la Universidad Politécnica-UPOLI.

3.2. Materiales utilizados

3.2.1. Materiales

Tubos con roscas de 11 ml y 20 ml, tapa roscas para tubos de ensayo, gradillas, cuchara espátula, placas Petri sencillas, placas Petri dobles, Beakers 100, 250 ml, probetas de 25, 50 y 500 ml, Erlenmeyers de 250, 500 y 1000 ml, asas de siembra metálicas circulares y rectas, pipetas automáticas, pipetas serológicas de vidrio de 1, 5 y 10 ml, puntas de pipetas, embudo de vidrio, pro pipetas, algodón, gasa, guantes látex, mascarillas, marcador permanente, tape, tijera, papel kraft, papel de aluminio, papel filtro, guantes para aislamiento de calor, cepillos de limpieza, parafilm, magnetos, cinta testigo, detergente, toallas de papel.

3.2.2. Equipos

Incubadora, horno, shaker, autoclave, Ph-metro, agitador vórtex, balanza electrónica, baño maría, hotplate, refrigerador, centrifuga multiusos, cabina de flujo laminar, mechero bunsen, cronómetros, espectrofotómetro, destilador de agua.

3.2.3. Reactivos y Medios de cultivo

Agar caseína (Difco®), Agar nutriente (Difco®), Caldo Nutriente (Acumedia®), Foling-Ciocalteau, Urea, hidróxido de sodio (NAOH), Ácido clorhídrico (HCL), fosfato monobásico de potasio, tirosina, ácido tricloroacético (TCA), Cloruro de calcio, levadura torula, melaza, Solución Salina, Agua Destilada, fenol, permanganato de potasio, formalina, alcohol 100%.

3.3. Duración del estudio

El estudio se realizó en el período de septiembre a octubre del año 2016. El desarrollo de esta investigación se dividió en tres fases, las cuales serán explicadas en su respectivo acápite.

3.4. Análisis estadístico

El análisis fue realizado con la utilización del método estadístico de coeficiente de variación, confirmando los datos con la correlación lineal de pearson en el programa SPSS (Versión 24.0, Statistics Base, IBM, USA).

3.5. Fases del estudio

3.5.1. Reactivación y preparación de solución madre

Las cepas preservadas en caldo leche, fueron inoculadas en placas petri conteniendo 20 ml de agar nutriente e incubadas a 38°C por 24 horas, posteriormente fueron inoculadas nuevamente en Erlenmeyers con 50 ml de caldo nutriente e incubadas a 38°C por 24 horas en un agitador orbital a 150 rpm (Anexo 2).

3.5.2. Preparación de medios de cultivo modificados

Fueron preparados con variables establecidas de melaza, levadura torula y cloruro de calcio dihidrato a distintas temperaturas para cada medio de cultivo modificado, esterilizado a 121°C durante 20 minutos (Anexo 4), distribuidos por triplicado e inoculando 1 ml de las muestras preparadas por diluciones seriadas de cada cepa en Erlenmeyer con 50 ml del medio preparado (Anexo 6) y se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm con tiempo de fermentación de 24 horas (Anexo 7).

3.5.3. Determinación de Unidades de Anson

Para su determinación fue empleada la metodología según Sigma (Cupp, 2008), utilizando caseína como sustrato (Mcconn et al, 1964; Anson, 1973). Se realizó previamente una curva patrón de acuerdo al ensayo (Anexo 10), luego se procedió a la preparación de caseína desnaturalizada, en la cual se utilizó agar caseína, hidróxido de sodio, urea y fosfato monobásico de potasio para ajustar a un pH óptimo, donde en el estudio se ajustó a un pH 10 (Anexo 8), procediendo así a la determinación de Unidades Anson utilizando sustrato de caseína previamente preparado, extracto de crudo enzimático, ácido tricloroacético, hidróxido de sodio, folin-ciocalteau, para luego proceder con su lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 300 nm (Anexo 13).

Una unidad enzimática es definida como la cantidad de enzima que bajo las condiciones del ensayo, libera 1 μg de aminoácidos positivos al reactivo de Folin por minuto, calculados como tirosina (Gopal et al, 2007).

Para el calculo de las unidades de actividad esta dado por la siguiente formula:

$$U/ml = 0,533 (DO) \times K \times D$$

Donde 0,5= Volumen de enzima en el analisis, DO= Absorbancia (μ moles de tirosina),
K= Tamaño de la cubeta (Generalmente 1cm), D= Dilución del extracto enzimatico.

3.5.4. Determinación de proteólisis de caseína

Se utilizó cultivo agar nutriente-caseína donde cada placa petri contenía 20 ml del medio con pH 7.5, se inoculó 10 μ l de las muestras preparadas por diluciones seriadas de cada cepa en cada pocillo y se incubaron a 38°C siendo leídas a las 24 horas posteriormente (Anexo 15). Las cepas candidatas fueron identificadas molecularmente hasta especie (Anexo 17).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la actividad enzimática de tres cepas de *Bacillus spp* (X5CD⁻⁹, X5C⁻⁹ y X2⁻¹⁰) productoras de enzimas proteolíticas según la metodología expuesta en materiales y métodos.

En el cuadro 1, se presentan los resultados del estudio cinético de la capacidad de hidrolizar la caseína de las 3 cepas de *Bacillus spp*. Se observó que la cepa X2⁻¹⁰ produjo un mayor halo de hidrólisis, con 30 mm a las 24 horas de incubación. La capacidad proteolítica de las cepas se reconoció mediante la medición de halos alrededor del inóculo (Anexo 16).

Cuadro 1. Resultados de halos de hidrólisis

Cepas	Actividad Proteolítica (mm)
X5CD ⁻⁹	24
X5C ⁻⁹	26
X2 ⁻¹⁰	30

En la figura 1, se presentan los resultados de la actividad enzimática de las cepas productoras de enzimas proteolíticas en medio líquido a partir de las cepas X5CD⁻⁹, X5C⁻⁹ y X2⁻¹⁰. En ella se representan los valores promedio de actividad enzimática obtenidos cuando se ensayaron las diferentes combinaciones. En donde se refiere a la cepa X2⁻¹⁰ con una óptima producción de 17.5336 Unidades Anson, en el medio modificado de la corrida número 3.

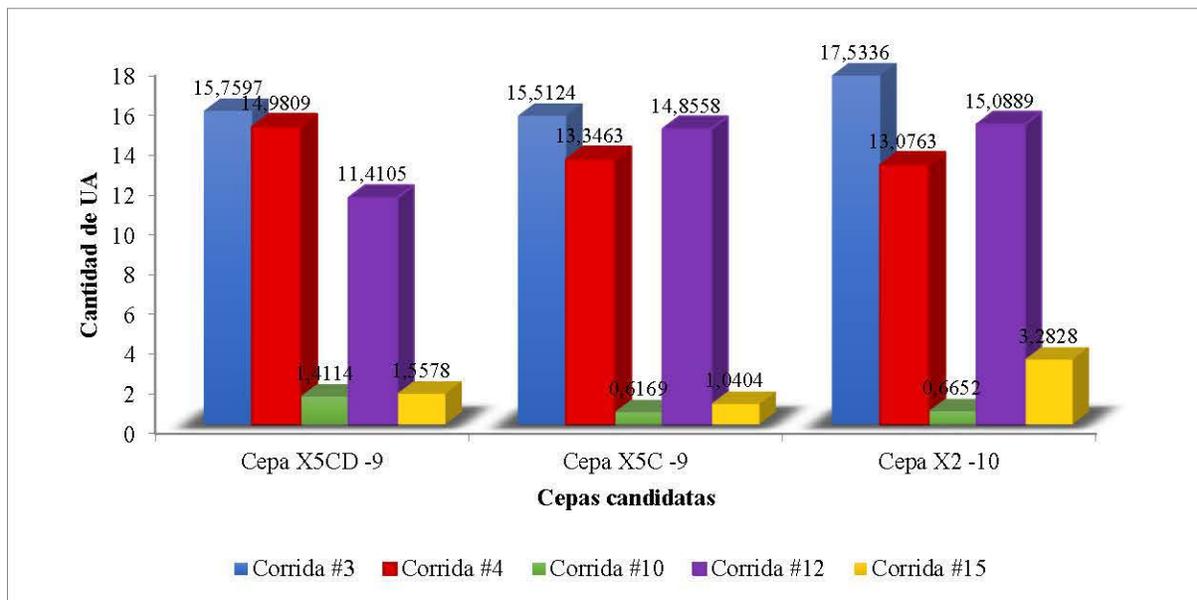


Figura 1. Resultados de la determinación de Unidades Anson.

En la figura 2, Los resultados de la determinación de un medio de cultivo industrial reflejan que de 3 de las 5 corridas tuvieron buena expresión en el crecimiento y los sustratos que los componen fueron aprovechados por las 3 cepas candidatas demostrando que tienen la capacidad de sintetizar enzimas para cada una de las sustancias utilizadas, obteniendo el mejor coeficiente de variabilidad para la corrida 3 con los siguientes resultados; 7.19% X5CD⁻⁹, 0.23% X5C⁻⁹ y 22.05% X2⁻¹⁰.). A mayor valor del coeficiente de variación mayor heterogeneidad de los valores de la variable; y a menor., mayor homogeneidad en los valores de la variable (Anexo, 5). Aunque son escasos los trabajos de optimización de medios para proteasas de *Bacillus spp*, se informan trabajos de laboratorio de medios que contienen sólo uno o dos constituyentes complejos con muy pocas o ninguna sales, ello sugiere que los requerimientos nutricionales para la producción de estas enzimas, no son elevados (Ajimoto, 1973 citado por Pérez, 2000).

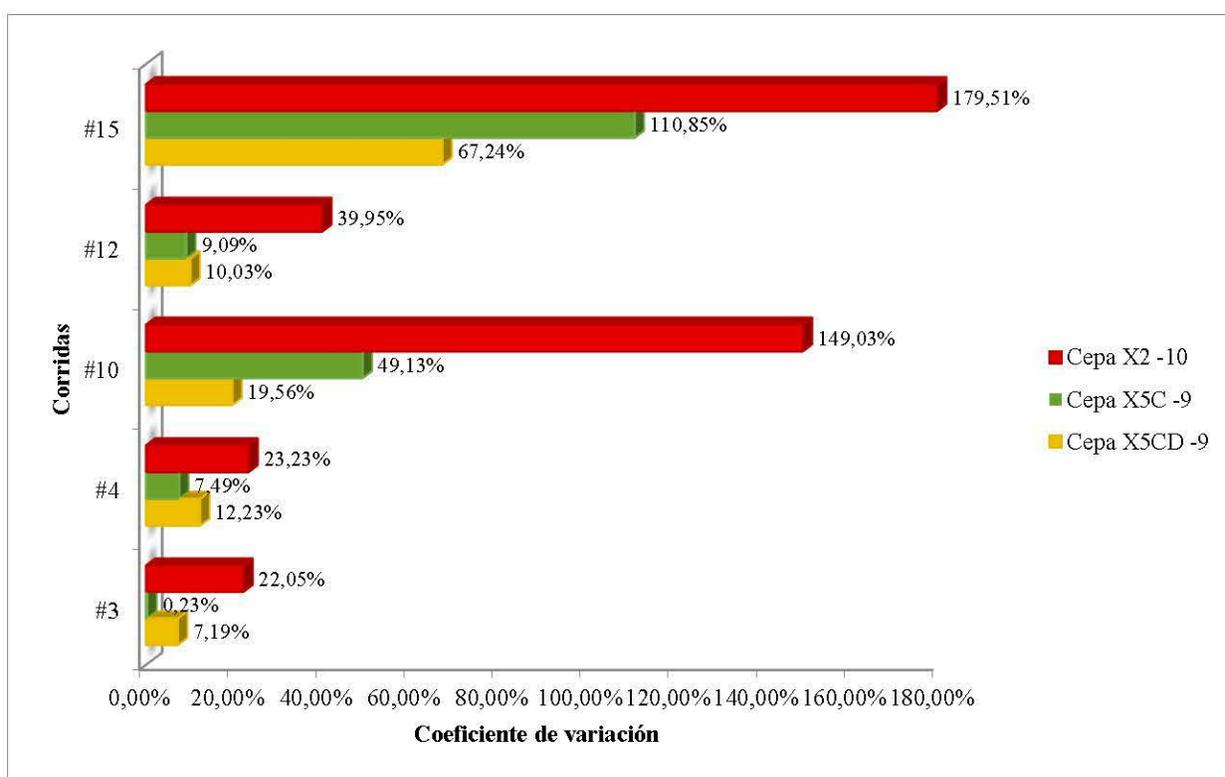


Figura 2. Resultados de la determinación del medio industrial.

En el cuadro 2, se muestra la formulación para cada corrida: Melaza como fuente de carbono, Levadura torula como fuente de nitrógeno, Calcio para la producción de enzimas hidrolíticas y Temperatura para la óptima reproducción de los microorganismos. La cantidad de cada factor utilizado en los medios modificados para la determinación de un medio de cultivo industrial, fueron los siguientes:

Cuadro 2. Composición de medios modificados de las corridas

Número de Corrida	Factor 1 A: Melaza g/l	Factor 2 B: Levadura g/l	Factor 3 C: Calcio g/l	Factor 4 D: Temperatura °C
3	75	50	1.5	39
4	50	40	1	38
10	50	60	1	40
12	50	40	2	38
15	50	40	1	40

Según los resultados apreciados en (González et al, 1998), desarrollaron un estudio cinético de la capacidad de hidrolizar la caseína de las 4 cepas de *Bacillus spp* con actividad proteolítica seleccionadas, midiéndose los valores de halos a la 12, 24, 36 y 48 horas, observándose crecimiento de 20-24 mm a las 24 horas de incubación

Según (Sawicka & Malonowska, 1982; Kamel et al, 1995 citados por Pérez, 2000), señalan que el rango de temperatura óptimo entre 35-40 °C, señalado para la síntesis y secreción de proteasas por cepas de *Bacillus spp*, relacionando la temperatura la cual es un factor importante que afecta la actividad de las proteasas, debido a que provoca hidrólisis en los enlaces y la consecuente desnaturalización de la proteína y la producción de enzimas por cepas pertenecientes a este género.

Es de destacar que el crecimiento de las células microbianas está muy influenciado por el pH. En muchos casos, al igual que para la temperatura el pH donde se obtiene la mayor razón de crecimiento específico, difiere del pH óptimo para la síntesis de la enzima por la misma cepa (González et al, 1998).

Las proteasas estables a un pH 12 son ejemplos de la adaptación enzimática, donde reflejan su pH óptima de 9.0-11.0 (Priest, 1977). Resultados reflejados por (Mcconn et al, 1964) refleja que la enzima fue estable entre los pH de 6.5-9.7. (González et al, 1998) (Zaragoza, 2011) mencionan que el pH óptimo para estos microorganismos es de 7.5, sin embargo especies pertenecientes a este género como el *Bacillus spp*, los valores de actividad proteasa-serina daban en pH de 8.5-10.5, lo que nos indica que a pH 10-11 hay actividad y tolerancia para el funcionamiento de la proteasa.

Los microorganismos del género *Bacillus* son poco exigentes desde el punto de vista nutricional, no requieren de medios de cultivos específicos, son fácilmente reproducibles y muy resistentes a altas temperaturas, a las radiaciones ultravioletas e ionizantes y a muchos productos químicos tóxicos (Mayea *et al.* 1997 citado por Millian, 2008).

La mayoría de *Bacillus spp.* Tienen una amplia gama de sistemas enzimáticos hidrolíticos y menudo son capaces de utilizar la materia orgánica que consiste en mezclas complejas típicas de la mayoría de los desechos, con excepción del grupo *Bacillus cereus*, son saprofitos inocuos que no producen toxinas y se incluyen en el grupo de organismos generalmente reconocidos como seguros (Da Silva *et al.*, 2007).

El autolizado de levadura torula que es complejo en su composición y empleado a concentraciones adecuadas, induce la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas cuando se emplea 40 g/litro de autolizado de levadura torula en el medio de cultivo que cuando se emplea a 60 g/litro, La melaza, como fuente de carbono la glucosa es el metabolito represor más común; pero su acción puede ser prevenida con cantidades mínimas de esta fuente de carbono en el medio de cultivo microbiano (González *et al.*, 1998; Pérez, 2000). Por su parte el calcio es un componente esencial, siendo el mejor inductor para la producción enzimática de las cepas *Bacillus spp.* Donde se señala que los niveles óptimos de calcio para la producción de enzimas hidrolíticas por estas cepas se encuentra entre 1.5 y 2.0 g/l y su presencia es requerida e indispensable para la síntesis y la actividad enzimática (Mcconn *et al.*, 1964; Kobayashi *et al.*, 1996; Ghorbel *et al.*, 2002).

La síntesis máxima de enzimas extracelulares normalmente se produce antes de la esporulación en fase exponencial tardía y fase estacionaria temprana del crecimiento. Sin embargo, la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria del crecimiento a menudo se acompaña por un agotamiento de la fuente de carbono del medio (Priest, 1977; Ferrero *et al.* 1996).

V. CONCLUSIONES

La evaluación para la determinación de la actividad enzimática realizada a las 3 cepas candidatas de *Bacillus spp* X5CD⁻⁹, X5C⁻⁹ y X2⁻¹⁰, demuestra que la cepa X2⁻¹⁰ seleccionada por su halo de hidrólisis sobre agar nutriente caseína con 30 mm resulto ser la mejor productora de enzimas proteolíticas con 17.5337 UA en la corrida número 3 con valores en su composición de: Factor 1: Melaza 75 g/l, Factor 2: Levadura 50 g/l, Factor 3: Calcio 1.5 g/l, Factor 4: Temperatura 39 °C, comprobando que el medio modificado estimuló el crecimiento de las cepas en condiciones de cultivo a escala de laboratorio, el bajo costo y la alta disponibilidad de la materia prima fundamental, propician la posible factibilidad económica del empleo de este producto y que la cepa X2⁻¹⁰ muestra “in vitro” características potenciales para su futura utilización en la industria de producción animal.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios más específicos para la identificación de la variedad del *Bacillus spp.* utilizada en el estudio.
2. Purificar la enzima a escala industrial para ser utilizada en la producción animal y otras industrias.
3. Realizar estudios para evaluar la actividad proteolítica en suplementos que puedan ser administrado en animales.
4. Realizar estudios in vivo para evaluar la efectividad de los tratamientos con las enzimas.
5. Escribir un proyecto de plan de negocio para la utilización de la enzima en la industria de producción animal.

VII. LITERATURA CITADA

Alfaro, I; Hernandez, A. (2003). Microbiologia Industrial. San Jose, Costa Rica, EUNED.

Allaert Vandevenne, C; Escola Ribes, M. (2002). Metodos de analisis microbiologicos de alimentos. Madrid, España. Dias de Santos.

Anson, L. (1938). The Estimation Of Pepsin, Trypsin, Papain, And Cathepsin With Hemoglobin. (En línea). The Journal Of General Physiology 79-89. (Consultado el: 12 Ene 2017). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213732/>

Ascunce Del Sol, G; González, G ; González, R; Milián Florido, G; Pérez Quintana, M; Piad Barreras, R. (1998). Aislamiento Y Caracterización De Cepas De Bacillus Spp. Productoras De Enzimas Proteolíticas Para La Producción De Hidrolizados De Proteínas. (En línea). Revista Avanzada Científica Vol. 1 No. 3 (Consultado el: 24 Ene 2017). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5074584>

Balatti; A; Lorda, G; Pastor, M. (2001). Protease obtention using Bacillus subtilis 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates.(En línea). Brazilian Journal of Microbiology Brazilian Journal of Microbiology. vol.32, n.1,p 6-9. (Citado el: 20 Oct 2016). Disponible: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822001000100002&script=sci_arttext

Becker, J.M., Caldwell, G.A. y Zachgo, E.A. (1996). Biotecnología : curso de practicas de laboratorio. Zaragoza, España. Acribia.

Collins, C.H., Lyne, P.M. y Tarazona Vilas, J. (1989). Metodos microbiologicos. Zaragoza, España. Acribia.

Gopal, J; Sarvesh, K; Vinay, S. (2007). Production Of Moderately Halotolerant, Sds Stable Alkaline Protease From Bacillus Cereus MTCC 6840 Isolated From Lake Nainital, Uttaranchal State, India. (En línea). Brazilian Journal of Microbiology 38:773-779. (Consultado el: 22 Feb 2017). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000400034

Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. (En línea). *J. Vis. Exp.* (19) 899, (Consultado el: 18 Oct 2016). Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/life-science-video/universal-protease.html>

Da Silva, C; Delatorre, A; Martins, M. (2007). Effect Of The Culture Conditions On The Production Of An Extracellular Protease By Thermophilic Bacillus Sp And Some Properties Of The Enzymatic Activity. (En línea). Brasil. Brazilian Journal of Microbiology 38:253-258. (Consultado el: 10 Feb 2017). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822007000200012&lang=pt

Castro, G; Ferrero, M; Sineriz, F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. (En línea). *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:327-332. (Consultado el: 11 Feb 2017). Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/225975059_Thermostable_alkaline_proteases_of_Bacillus_licheniformis_MIR_29_Isolation_production_and_characterization

Frazier, W.C; Westhoff, D.C. (2003). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España. Acribia.

Ghorbel, B; Nasri, M; Sellami-Kamoun, A. (2003). Studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. (En línea). *Enzyme and Microbial Technology* 32:513-518. (Consultado el: 11 Feb 2017). Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Alya_Sellami-Kamoun/publication/223571456_Stability_studies_of_protease_from_Bacillus_cereus_BG1/links/543d53dd0cf240f04d0f8f5f.pdf

Gonzalez, E; Gonzalez, R, Piad, R. (2011). Sustitución de antibióticos promotores del crecimiento en la producción animal, por aditivos alternativos producidos en Nicaragua. (En línea). Managua, Nicaragua. Centro de Biotecnológico. Universidad politecnica. (Consultado 15 Oct 2016) Disponible en: http://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/IDFlowcharts.pdf

Hakamada, Y; Hitomi, J; Kobayashi, T; Susumu, I. (1996). Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. (En línea). *Applied Microbiol Biotechnol* 45:63-71. (Consultado el: 11 Feb 2017). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/230776046_Purification_of_alkaline_proteases_from_a_Bacillus_strain_and_their_possible_interrelationship

Lee, B. (1996). *Fundamentos de biotecnología de los alimentos*. Zaragoza, España. Acribia.

Mconn, J; Tsur, D; Yasunobu, K. (1964). *Bacillus subtilis* Neutral Proteinase. (En línea) USA. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 239, No. 11 (Consultado el: 10 Feb 2017). Disponible en: <http://www.jbc.org/content/239/11/3706.full.pdf><http://www.jbc.org/content/239/11/3706.full.pdf>

Milan, G. (2008). Obtención de cultivos de *Bacillus* spp y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Nascimento, W; Martins, M. (2004). Produção e propriedades de uma protease extracelular de um *Bacillus* sp termofílico. (En línea) *Brazilian Journal of Microbiology*. vol.35, n.1-2, p.91-96 (Citado el: 20 Oct 2016). Disponible: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822004000100015&script=sci_abstract&lng=pt

Obando Rosales, O; Suárez Quintero, Y. (2015). Obtención de cepas autóctonas de *Bacillus* spp. y su evaluación probiótica in vitro. Tesis para optar al título de Médico Veterinario el grado de Licenciatura. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria.

Pérez Quintana, M. (2000). Obtención de un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* y Evaluación de su actividad probiótica. Obtención de un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”

Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*. (En línea) *Bacteriological Reviews*, Vol. 41, No. 3. p. 711-753 (Citado el: 20 Oct 2016). Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC414021/#reference-sec>

Scragg, A. (2004). Biotecnología para ingenieros : Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Mexico, Mexico. Limusa.

Smith, J.E. (2004). Biotecnología. Zaragoza, España. Acribia.

Uehara, H; Yoneda, Y; Yamane, K; Maruo, B. (1974). Regulation of Neutral Protease Productivity in *Bacillus subtilis*: Transformation of High Protease Productivity. *Journal of Bacteriology*. (En línea) Vol. 119, No. 1 p. 82-91 (Citado el: 20 Oct 2016). Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC245576/>

Zaragoza, J. (2011). Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. (En línea). Tesis presentada en opción al grado de maestría en ciencias con orientación en microbiología industrial. México. Universidad Autónoma De Nuevo León. (Consultado el: 17 Ene 2017). Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2955/1/1080224404.pdf>

VIII. ANEXOS



Anexo 1. Solución madre de cepas candidatas



Anexo 5. Medios modificados preparados.



Anexo 2. Reactivación de cepas.



Anexo 6. Inoculación en medios modificados.



Anexo 3. Materiales utilizados en la preparación de diluciones seriadas.



Anexo 7. Incubación en agitador orbital.



Anexo 4. Preparación de medios modificados.



Anexo 8. Preparación del sustrato caseína.



Anexo 9. Ajuste de Ph del sustrato caseína.



Anexo 13. Lectura de actividad enzimática.



Anexo 10. Curva patrón de tirosina.



Anexo 14. Preparación de diluciones seriadas.



Anexo 11. Reactivos para determinación de Unidades de Anson.



Anexo 15. Siembra en Agar leche.



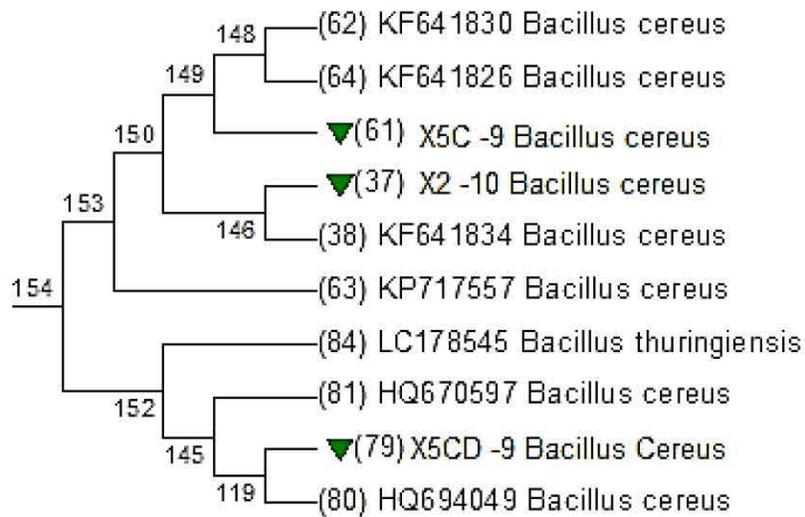
Anexo 12. Muestras listas para lectura.



Anexo 16. Halos de hidrólisis de caseína.

Código Laboratorio	Código microorganismo	Vecino cercano (Número acceso)	Max score	Ident (%)	Identidad final
O (61)	X5-9E2 (X5C)	<i>Bacillus cereus</i> (KF641830)	1083	99	<i>Bacillus cereus</i>
R (37)	X2-10(2)2 (X2)	<i>Bacillus cereus</i> (KF641834)	1555	98	<i>Bacillus cereus</i>
S (79)	X5-9CD2 (X5CD)	<i>Bacillus cereus</i> (HQ694049)	1194	98	<i>Bacillus cereus</i>

Anexo 17. Identificación Molecular de los Microorganismos



Anexo 18. Árbol filogénico de los Microorganismos