



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS TROMBOLÍTICAS Y/O
FIBRINOLÍTICAS A PARTIR DE MICROORGANISMOS DEL SUELO”**

Realizado por:

Sebastián Alejandro Cañizares Villalba

Director de proyecto:

Lino Arisqueta H., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 5 de Abril de 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, SEBASTIÁN ALEJANDRO CAÑIZARES VILLALBA, con cédula de identidad # 0927754945, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS TROMBOLÍTICAS Y/O
FIBRINOLÍTICAS A PARTIR DE MICROORGANISMOS DEL SUELO”**

Realizado por:

SEBASTIÁN ALEJANDRO CAÑIZARES VILLALBA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA H., PhD

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

ALBERTO AGUIRRE BRAVO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Artículo de tesis

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS TROMBOLÍTICAS Y/O FIBRINOLÍTICAS A PARTIR DE MICROORGANISMOS DEL SUELO, Trabajo final de Grado

Sebastián Cañizares¹, Lino Arisqueta^{2,*}

¹ Afiliación 1; sacanizares.bio@uisek.edu.ec. Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas - UISEK

² Afiliación 2; lino.arisqueta@uisek.edu.ec. Facultad de Ciencias de la Salud – UISEK.

* Autor de Correspondencia: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

Resumen: Este artículo aborda la problemática de las enfermedades cardiovasculares (ECVs), las cuales continúan siendo la principal causa de muerte a nivel mundial. La hipótesis de la investigación se enfoca en si es posible aprovechar enzimas de origen microbiano con propiedades trombolíticas y/o fibrinolíticas para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Se utilizó medios de cultivo selectivos para bacterias productoras de proteasas y se realizaron ensayos para gelatinasas y caseinasas. La actividad enzimática no específica se midió mediante el método con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, se realizaron ensayos con coágulos de sangre, identificando que *B. megaterium* y *S. liquefaciens* presentan dichas actividades. Se concluye que *B. megaterium* es un organismo prometedor para producir enzimas capaces de disolver trombos.

Palabras clave: Enfermedades cardiovasculares; enzimas microbianas; trombolítico; fibrinolítico; actividad enzimática; reactivo de Folin-Ciocalteu; *B. Megaterium*; *S. liquefaciens*.

Abstract: This article addresses the issue of cardiovascular diseases (CVDs), which continue to be the leading cause of death worldwide. The research hypothesis focuses on whether microbial-derived enzymes with thrombolytic and/or fibrinolytic properties can be exploited for the treatment of these diseases. Selective culture media for protease-producing bacteria were used, and assays for gelatinases and caseinases were performed. Non-specific enzymatic activity was measured using the Folin-Ciocalteu method. Subsequently, tests were carried out with blood clots, identifying that *B. megaterium* and *S. liquefaciens* exhibit such activities. It is concluded that *B. Megaterium* is a promising organism for producing enzymes capable of dissolving thrombi.

Keywords: Cardiovascular diseases; microbial enzymes; Thrombolytic; fibrinolytic; enzyme activity; Folin-Ciocalteu reagent; *B. Megaterium*; *S. liquefaciens*.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la causa de muerte más persistente en todo el mundo, con cifras crecientes de hasta 8,4 millones de muertes según un informe del 2019 (CDC & National Center for Health Statistics, 2023; WHO, 2021). Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) de Ecuador, se reportaron 105,248 defunciones, de las cuales las enfermedades cardiovasculares representaron el 21,07% del total de causas de muerte hasta septiembre de 2022 (INEN, 2020) superando ampliamente a otras enfermedades. El primer informe sobre las enzimas fibrinolíticas como terapéuticas en el tratamiento de estas enfermedades data de 1952, cuando la tripsina mostró actividad antiinflamatoria, anticoagulante y trombolítica («Fibrinolytic and pholytic enzymes in therapeutics», 1954; INNERFIELD et al., 1952), lo que inició la investigación en este novedoso campo. Sólo 5 años más tarde, el primer ensayo

frente a otras familias de proteasas, es la eficacia y especificidad de las PrtSer en la degradación de la fibrina. Las PrtSer como la plasmina, la uroquinasa y el tPA pueden escindir específicamente la fibrina y disolver los coágulos, mientras que otras proteasas como las metaloproteasas pueden no tener la misma especificidad y eficacia (Abdul Rahim & Rengaswamy, 2022; Yaron et al., 2021)

Es necesario desarrollar rápidamente enzimas que puedan disolver los coágulos sanguíneos para tratar estas enfermedades. Esto ayudará a equilibrar el proceso natural del cuerpo de coagulación y disolución de coágulos. Esto plantea la cuestión de cómo obtener estas proteasas y cómo explotar sus propiedades para el desarrollo potencial de fármacos. Numerosos artículos han descrito métodos para aislar estas enzimas a partir de mamíferos (Owen, 2006) hongos (de Souza et al., 2015), bacterias (Rawlings et al., 2004) e incluso algas (Diwan et al., 2021). Se ha informado que las proteasas (o proteinasas/peptidasas) de origen microbiano no solo dominan el mercado de los detergentes, los textiles, la industria alimentaria, la biorremediación y, por supuesto, los laboratorios farmacéuticos, sino que también se están expandiendo rápidamente en estos últimos (Castro et al., 2011; Foysal & Lisa, 2018; Manzum & Mamun, 2018; Soundra Josephine et al., 2012). Además de su increíble bajo coste de producción (Craik et al., 2011; Diwan et al., 2021) poseen una amplia gama de propiedades, como alta tolerancia al pH, termoestabilidad y especificidad de sustrato, que permiten a los científicos desentrañar sus posibles beneficios para el bienestar humano (Razaq et al., 2019). Según la bibliografía, las bacterias productoras de PrtSer se pueden encontrar en *Bacillus*, *Streptococcus*, etc por nombrar algunos (Matkawala et al., 2021; Sharma et al., 2021). Estudios mencionan varias enzimas derivadas de estos microorganismos con distintas propiedades como las serpinas (involucradas en la circulación sanguínea), ecotinas (involucrada en anticoagulación) (Harish & Uppuluri, 2018), e incluso medicamentos derivados para tratar el VIH como el ritonavir (Solanki et al., 2021; Tigabu et al., 2020).

Por ello, esta investigación pretende explorar el potencial de las proteasas microbianas como agentes trombolíticos. El trabajo se centra en identificar y aislar nuevas fuentes bacterianas de estas enzimas, caracterizar sus propiedades y evaluar su capacidad para romper coágulos y restablecer el flujo sanguíneo normal. El objetivo último de este trabajo es contribuir al avance de los tratamientos trombolíticos aportando nuevos conocimientos sobre las propiedades y aplicaciones potenciales de estas enzimas. Al explorar estas áreas clave, esta investigación pretende ampliar nuestra comprensión de las proteasas y su impacto potencial en el campo de la trombólisis.

2. Materiales and Métodos 113

2.1. Equipos y reactivos 114

Tabla 1. Reactivos y productos químicos 115

Nombre	Proveedor/Marca
Tryptona	MP
Peptona	BD
NaCl	FisherScientific
Extracto de levadura	Cultimado
Gelatina	Sharlau
Gelatina (sin azúcar ni sabor), gelatina de piel bovina	Tienda
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	MallinCkrodt
Na ₂ HPO ₄	Baker
Tris	Sigma
Tritón X-100	Promega
HCl	Sigma
NaOH	FisherScientific
Kit de ensayo de proteínas BCA	Sigma Aldrich
Reactivos de tinción de Gram	Varios
Glicerol	Panreac
Leche desnatada sin lactosa	Tru®
Éter dietílico	FisherScientific
Na ₂ CO ₃	Sigma
Folin Ciocalteu reactivo fenol	Supelco ®

116

117

118

119

Tabla 2. Equipos

Nombre
Incubadora
Nevera
Espectrofotómetro
Autoclave
Escala analítica
Microscopio
Placa de calentamiento y agitación
Medidor de pH
Cabina de bioseguridad
Microonda
Centrífuga
Sonicador
Vórtice

120

2.2. Métodos

2.2.1. Aislamiento de bacterias

Se diseñó un protocolo combinado basado en Soundra (2012), Manzum & Mamun (2018) y Foysal & Lisa (2018). Durante la temporada de lluvias (meses de mayo y junio), se recogió un puñado de 10 g de suelo a 10 cm de profundidad con diferentes valores de pH utilizando una cuchara estéril. Las muestras fueron recolectadas en cuatro lugares diferentes de Quito, Ecuador, a saber:

- Parque Metropolitano
- Parque El Rosario
- Parque La Floresta
- Campus Miguel Cervantes UISEK

En cada uno de estos lugares, había árboles específicos: eucaliptos (que crecen en suelos con un rango de pH de 5,5 a 6,5) (Velázquez-Martí & Gaibor-Chavez, 2017), higueras (que crecen en suelos con un pH de 8 a 8,5) (Ramos et al., 1975) y pinos (que crecen en suelos con un rango de pH de 3,9 a 5,5) (Alejandra Karlanian et al., 2008). Se utilizaron estos árboles como biomarcadores de referencia para el pH del suelo.

Las muestras se trituraron, tamizaron y volvieron a pesar para obtener 10 g de cada muestra. A continuación, se diluyeron en 100 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,9%) y se calentaron a 80°C durante 10 minutos y se diluyeron en tubos de ensayo (10^{-2} – 10^{-6}). Utilizando un asa de inoculación y técnica aséptica, se esparcieron unas gotas en una versión modificada de las placas de agar gelatina descritas por Soundra. Por cada litro se disolvieron: peptona 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g y 100 ml de solución de gelatina al 1%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se repicaron (durante 3 a 5 días) hasta que se observaron colonias axénicas. Las únicas dos fuentes de carbono y nitrógeno fueron la peptona y la gelatina que promueven el crecimiento de microorganismos con capacidad de producir proteasas (Pant et al., 2015), mientras que el NaCl proporciona los iones de cloruro y sodio necesarios para el crecimiento microbiano.

2.2.2 Identificación bacteriana

Una colonia de cada placa de Petri conteniendo cultivos axénicos fue sometida a tinción de Gram para caracterizar la morfología los especímenes. Para la identificación bacteriana, se envió una placa recién estriada al Laboratorio Centro de Investigación Microbiológica (CIM) de la ciudad de Guayaquil para realizar un análisis por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*). Con ella se comparó el espectro de masas de los aislados bacterianos con la base de datos de referencia de espectros de masas de especies bacterianas conocidas. Las puntuaciones superiores a 1,99 se consideran identificaciones fiables (Vega-Castaño et al., 2012).

2.2.3 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y capacidad proteolítica in plate

Debido a la falta de calibración del espectrofotómetro de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas, no fue posible realizar una curva de crecimiento midiendo DO 600 nm por lo que no se incluyen datos numéricos en esta sección del artículo. Sin embargo, se realizaron simultáneamente diferentes pruebas de crecimiento a pH entre 3 y 11, sembrando cultivos puros en agar-gelatina descrito anteriormente y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se seleccionó el pH al que hubo un mayor y más rápido crecimiento de colonias. Para las tres cepas, el pH óptimo de crecimiento fue de 8, que es el que se escogió para obtener biomasa en adelante.

Para evaluar la capacidad proteolítica de las bacterias aisladas, se preparó un medio que contenía leche (Trü) y agar con algunas modificaciones (Morris et al., 2012). Por cada litro se mezclaron: 100 ml de solución de leche al 15% con 900 mL que contenían 15 g de agar. Las soluciones se prepararon por separado y se

esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. A continuación, ambas soluciones se mezclaron en una cabina de bioseguridad y se dejaron enfriar antes de colocarlas en placas de Petri. Se consideró actividad proteolítica cuando aparecían zonas o halos claros por la hidrólisis.

Para evaluar la capacidad de las bacterias para producir gelatinasas, se realizó un ensayo de hidrólisis de gelatina según un protocolo de la *American Society for Microbiology* (ASM) con algunas modificaciones (Dela Cruz et al., 2016). Se utilizó una solución que por cada litro contenía: 10 g de peptona y 100 g de gelatina. Se preparó y se dispensó en los tubos de ensayo en un volumen de 2 ml y se esterilizó en autoclave. Utilizando puntas de micropipeta estériles de 10 μ L, se tomó una colonia de una muestra bacteriana en placa y se pincharon los tubos de ensayo que contenían gelatina. Los tubos inoculados se colocaron en la incubadora a 37°C y se examinó la licuefacción en diferentes los puntos temporales de 1 hora, 24 horas y 48 horas tras la aplicación. Se utilizó un tubo de control y se dejó pasar un mínimo de 15 minutos para que la gelatina no hidrolizada se solidificara, a fin de evitar falsos positivos.

2.2.4 Extracción de proteínas

Se diseñó un método rápido y fiable de extracción de proteínas por sonicación basado en tres protocolos diferentes (Benchling, 2012; Diagenode - Innovating Epigenetic Solutions, 2018; Kwon & Jewett, 2015) con algunas modificaciones. Las bacterias aisladas se inocularon en medio líquido LB pH 8 recién preparado en tubos de 50 ml con un volumen de medio de 40 mL (por duplicado) y se cultivaron en una incubadora con agitador a 120 rpm a 37°C durante 72 horas. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en un volumen de 5 ml de tampón 50mM PBS pH 7 enfriado con hielo. En este paso los pellets duplicados se trasvasaron a un solo tubo de 50 mL. El precipitado resuspendido se centrifugó de nuevo a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Esta última parte era para lavar el cultivo restante y se hizo dos veces. Finalmente, el sobrenadante resultante se desechó y el pellet se resuspendió en un tampón de lisis NP-40 alternativo utilizando Triton X-100 en lugar de NP-40 (composición: NaCl 150mM, Triton X-100 1%, Tris-Cl 50mM pH 8). Antes de su adición, el tampón se ajustó a pH 7,4 y se añadió al pellet lavado hasta un volumen de 5 ml. La mezcla se dejó enfriar a -20°C durante una hora antes de sonicarla.

Posteriormente, se mantuvo la muestra en un baño de hielo con agua fría y un poco de sal, y se introdujo la sonda del sonicador en el tubo de 50 mL aproximadamente hasta la mitad de la suspensión, teniendo cuidado de no tocar el fondo del recipiente. A continuación, se probaron dos métodos de sonicación:

- 10 minutos para ciclos de 30 segundos de encendido y 60 segundos de apagado
- 10 minutos para ciclos de 30 segundos de encendido y 30 segundos de apagado

La sonda se limpió cuidadosamente con etanol al 70% y agua destilada entre muestra y muestra y los tubos se mantuvieron a un mínimo de 4°C en todo momento.

2.2.5 Cuantificación de proteínas

Inmediatamente después, se determinó la concentración de proteína total en la suspensión resultante empleando un kit de ácido bicinónico (BCA, Protein Assay Kit de Sigma-Aldrich®) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la cuantificación de proteína se prepararon diluciones de la misma concentración con el fin de añadir el mismo volumen de muestra a todos los ensayos cuantitativos y cualitativos.

2.2.6 Ensayo enzimático in vitro

La actividad proteasa se midió utilizando caseína como sustrato y midiendo la liberación de Tyr mediante absorbancia a 660 nm con el reactivo fenólico Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones (Abdelmoteleb et al., 2017; Sony & Potty, 2016; Anson, 1938)

Dado que la caseína no estaba disponible, se procedió a extraerla en ese momento utilizando métodos tradicionales (Maubois, 1984; Miller D.D, 2001). Se precalentaron 450 mL de agua destilada a 40°C, y después se añadieron progresivamente 300 mL de leche desnatada sin lactosa (LDSL) hasta que toda la mezcla estuvo a 40°C. La elección de la LDSL se hizo por ser apropiada para detectar la actividad de las proteasas (Morris et al., 2012) y eliminar contenidos no deseados como grasa, minerales y azúcares como la lactosa y otras proteínas del suero, lo que mejora enormemente la pureza de la caseína obtenida. A continuación, el pH se ajustó lentamente a 4,6 con HCl 0,1 M hasta que la leche cuajó y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el suero y el sedimento se filtró y se secó con papel de filtro. El precipitado resultante se lavó con 50 mL de etanol y se volvió a secar antes de pesar la cantidad total. Una vez registrados los gramos de caseína, el residuo se lavó con 5 ml de éter dietílico por gramo de caseína y se secó al aire a 40°C durante 10 minutos. El precipitado resultante tuvo un tono blanco cuando está húmedo y ligeramente amarillento cuando está seco.

Se preparó una solución al 1% (p/v) en PBS 50 mM pH 7 a partir de la caseína disponible. La solución de caseína y el extracto enzimático crudo se mezclaron en volúmenes iguales de 500 µl y se colocaron en un baño de agua a 40°C durante 20 minutos, de tal manera que en un V final de 1 mL hubiera 310 µg de extracto enzimático. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 1 mL de HCl 0.1 M y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, la mezcla de reacción se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante para posteriormente mezclarlo con 2,5 mL Na₂CO₃ 0.44 M y con 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 3 veces en agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos en una habitación oscura. A continuación, se midió la absorbancia a 660 nm como se ha descrito anteriormente. Los blancos correspondieron a el sustrato sin fuente enzimática.

2.2.7 Ensayos trombolíticos cualitativos y cuantitativos

Para comprobar la capacidad de estas enzimas para degradar los coágulos sanguíneos, se pusieron en contacto directo con sangre previamente pesada y coagulada. La sangre se extrajo de un joven en estado postprandial con sangre de tipo B positivo. La preparación del coágulo para el ensayo cualitativo se realizó según lo descrito Elnager con algunas modificaciones (Elnager et al., 2015). Se extrajeron aproximadamente 4 ml de sangre y se alicuotaron inmediatamente hasta un total de 800 µL en tubos de ensayo previamente esterilizados y se dejaron coagular durante 10 minutos a temperatura ambiente. A esto le siguió otro periodo de incubación de 3 horas, esta vez a 37°C. Por último, el suero se retiró cuidadosamente con una micropipeta y los tubos se secaron con papel de filtro y se pesaron de nuevo para determinar el peso exacto del coágulo formado. Los coágulos se estandarizaron a 0,4 ± 0.1 gramos. A continuación, se realizó un ensayo de lisis del coágulo mezclando 200 µl del lisado proteico estandarizado (124 µg) con los coágulos pesados e incubando en un baño de agua a 37°C y analizando el peso al cabo de una hora descartando el líquido en exceso.

3. Resultados

3.1 Aislamiento e Identificación bacteriana

Tabla 3. Tabla de identificación bacteriana por tinción Gram y análisis Maldi-Tof

Lugar	Identificación	MALDI-TOF Score	Gram	Morfología	Abreviatura
Parque Metropolitano	<i>Ralstonia pickettii</i>	2,01	-	Bastones alargados	RP
Parque El Rosario	<i>Bacillus megaterium</i>	2,039	+	Bastones alargados y aglomerados	BM1
Parque La Floresta	<i>Bacillus megaterium</i>	2,531	+	Bastones alargados y ligeramente separados	BM2
Campus Universidad SEK	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,2	-	Bastones alargados con centros oscuros	SL

Empleando el método descrito se aislaron cuatro cepas distintas que mostraron capacidad de degradar gelatina y/o caseína presente en el agar de las placas de cultivo. Estos resultados se muestran en la siguiente sección de resultados. La *Ralstonia pickettii* presenta los datos obtenidos de la tinción Gram y el análisis morfológico, y de la identificación mediante MALDI-TOF para las muestras seleccionadas. Como puede observarse, los scores de las identificaciones se encuentran en el rango aceptable para una identificación a nivel de género y especie. Dos cepas correspondieron a *Bacillus megaterium*, una a *Ralstonia pickettii* y la última a *Serratia liquefaciens*.

Desafortunadamente, *R. pickettii* se perdió durante los experimentos posteriores, pero el resto permaneció intacto y cuidadosamente conservado en glicerol al 20% a -20 ° C. En paralelo, se realizaron ensayos de caracterización para determinar las condiciones de crecimiento adecuadas y la capacidad de degradar gelatina y caseína *in plate*. Una zona clara de hidrólisis indicó que estos aislados eran capaces de producir proteasas, haciéndolos efectivamente utilizables para experimentos posteriores.

3.2 Condiciones de crecimiento y capacidad de hidrolizar gelatina y caseína

Para determinar el pH óptimo de hidrólisis de gelatina, las cepas se sembraron en placas conteniendo gelatina a pH alcalino, neutro y ácido (fig. 2). Como puede observarse, el mejor de los pH, para BM1, fue el de 9, mostrando mayor crecimiento y halos de degradación de gelatina. Las fotografías, no permiten apreciar este último hecho con toda la claridad con que se observó en su momento. No se muestran placas a pH 3 ni pH 11 ya que no hubo crecimiento.

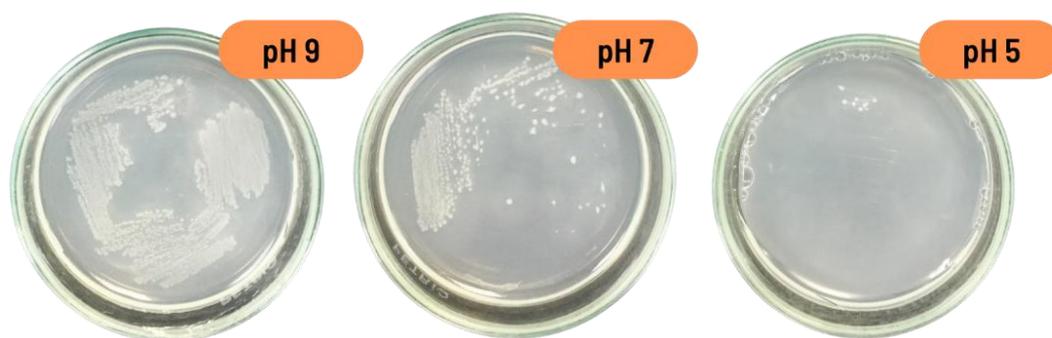


Figura 2. Crecimiento en placas de agar-gelatina de BM1 a diferentes pH

La figura 3 muestra el crecimiento de BM2 en las mismas condiciones. En este caso, el mejor crecimiento se dio entre pH 9 y 7. A pH cinco no hubo ningún crecimiento y mucho menos a pH 3 y 11, placas que no se muestran.

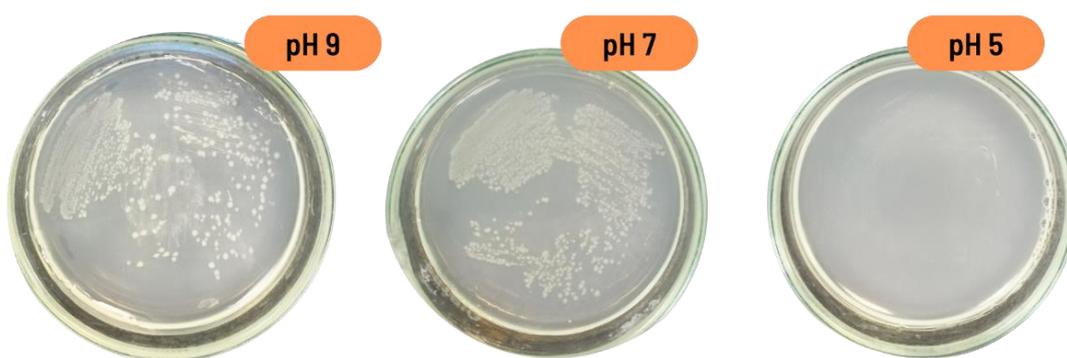


Figura 3. Crecimiento en placas de agar-gelatina de BM2 a diferentes pH

Por último, SL creció de manera muy similar a pH 9, 7 y 5. En este caso, a pH 3 y pH 11 tampoco hubo crecimiento.

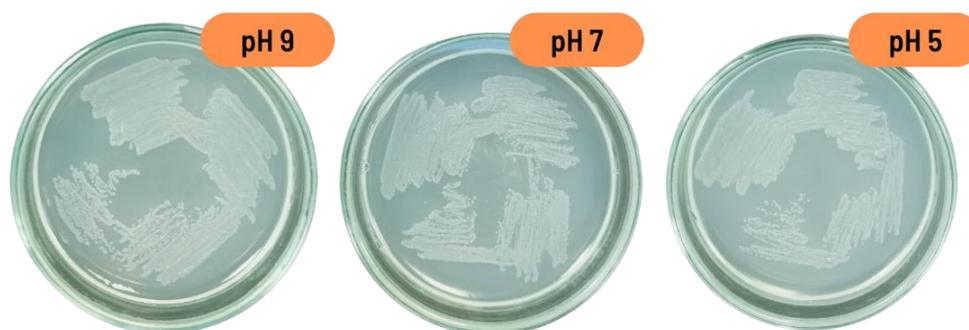


Figura 4. crecimiento en placas de agar-gelatina de SL a diferentes pH

Además de la actividad gelatinasa *in plate* que se muestra más arriba y que, debido a la calidad de las fotografías, no puede apreciarse adecuadamente, también se determinó la actividad gelatinasa pinchando colonias en tubos de ensayo con gelatina y peptona, y midiendo cualitativamente el grado de licuefacción al cabo de 1, 24 y 48 horas. Al cabo de 1 hora no se observaron cambios en los tubos. En la figura 5 se

muestran los resultados por duplicado a pH 5, 7 y 9 al cabo de 24 horas de incubación. A pH 5, y de acuerdo con lo observado *in plate*, no se apreció licuefacción en ninguna de las cepas aisladas. A pH 7 BM1 tuvo la mayor actividad, siendo la actividad de BM2 y SL apreciablemente menor y muy similar entre ellas. A pH 9 la mayor licuefacción se produjo en SL y en uno de los duplicados de BM2, siendo la actividad de BM1 poco apreciable. Al cabo de 48 h a pH 7 y 9 se había producido la licuefacción total de las muestras por parte de las tres cepas en análisis.

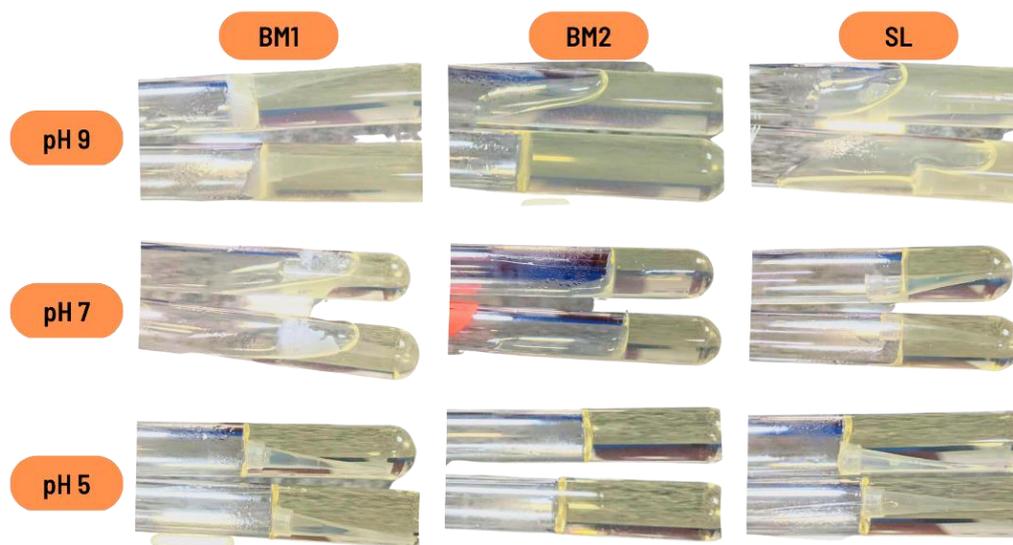


Figura 5. Prueba de hidrólisis de gelatina a diferentes pH al cabo de 24 horas de incubación a 37°C

En cuanto a la actividad caseinasa *in plate*, ésta se evaluó a pH 7, un pH cercano al óptimo de crecimiento y de la actividad gelatinasa. En la **figura 6** se pueden ver los resultados para las tres cepas: todas ellas tuvieron actividad caseinasa. En este caso, las fotografías permiten ver mejor el halo de hidrólisis.



Figura 6. crecimiento en placas de agar con caseína al 15% de BM1, BM2 y SL después de 24 horas de incubación a 37°C

3.3 Extracción de proteínas

Una vez observadas las características de interés, se inició el protocolo de extracción de proteínas según los métodos descritos. Se compararon dos métodos de extracción que implicaban intervalos distintos de sonicación y apagado durante 10 minutos: (método 1) 30 s encendido/60 s apagado vs (método 2) 30 s encendido/30 s apagado. La **figura 7** muestra la comparación de los rendimientos para las tres cepas en varios experimentos. Aunque el segundo método parece tener mayor rendimiento, no hay diferencias estadísticamente significativas (aunque para BM1 se acercó, $P = 0,09$) entre los dos métodos de extracción, por lo que se optó por el método 2 debido a que tenía un mayor número de ciclos de sonicación en el mismo tiempo y aparentemente daba mayor rendimiento.

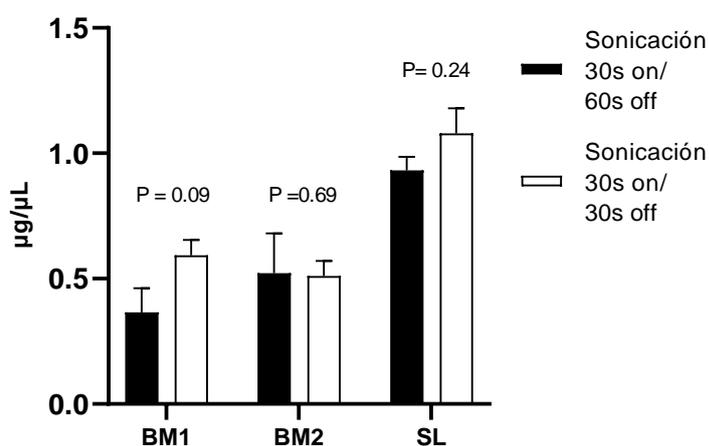


Figura 7. Comparación del rendimiento en la extracción de proteína bacteriana de dos métodos de sonicación

3.4 Ensayo enzimático

Como primer paso antes de proceder a la purificación de la actividad proteasa de las cepas aisladas se desarrolló un ensayo que pudiera ser cuantitativo. Para ello se optó por un ensayo proteasa en la que se medía la liberación de Tyr de la proteína empleada como sustrato, en este caso caseína purificada de la leche en los laboratorios UISEK. A falta de estándar de Tyr, no se pudo calcular la actividad específica de las distintas muestras y, por tanto, no se pudo purificar la actividad. Sin embargo, sí se puso a punto el ensayo para que en cuanto se compre el estándar de Tyr se pueda expresar la actividad específica y, al purificar la actividad, el grado de purificación (fold change). Además, el ensayo permitió identificar la cepa con la mayor actividad caseinasa. Las imágenes del procedimiento se muestran en el Anexo I.

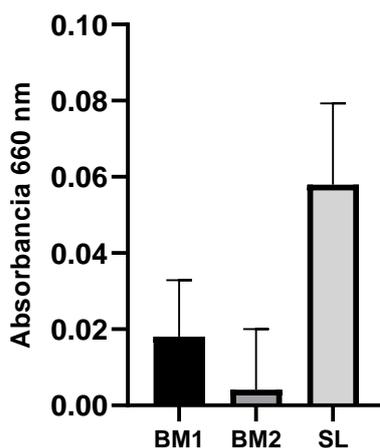


Figura 8. Actividad caseinasa de los lisados bacterianos de las tres cepas. Se determinó la Abs 660 nm correspondiente a la liberación de Tyr por la actividad proteolítica. Se muestra el valor medio \pm el error estándar de tres réplicas menos el blanco.

La figura 8 muestra los resultados del ensayo *in vitro* de la actividad caseinasa. Como puede observarse, SL mostró la mayor actividad, hasta tres veces superior a BM1 y más de 10 veces la de BM2.

3.5 Lisis de coágulos sanguíneos *in vitro*

Finalmente, y dado que el objetivo de este trabajo es, en última instancia, emplear las proteasas bacterianas como tratamiento contra la trombosis, se procedió a realizar un ensayo de lisis de coágulos sanguíneos *in vitro* (fig. 9). A las muestras de sangre coagulada (apartado 2.2.7. de Materiales y Métodos) se les añadieron 124 μ g de proteína en 200 μ L del lisado correspondiente y se incubaron por 1 h tras lo cual los coágulos se volvieron a pesar.

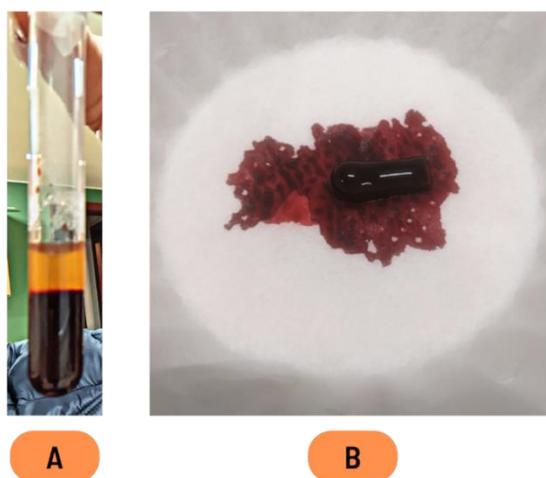


Figura 9. Tratamiento de coágulos sanguíneos. (A) muestra el suero formado después de la incubación. (B) Coágulo de sangre después de la extracción del suero y secado en un filtro de papel antes de la ponderación

Tabla 4. Peso de los coágulos sanguíneos antes y después del tratamiento con lisado de proteínas

MUESTRA	BM1		BM2		SL	
	A	B	A	B	A	B
PESO INICIAL	0,41	0,44	0,42	0,53	0,44	0,46
PESO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (g)	0,41	0,44	0,36	0,47	0,38	0,46

BM1, no tuvo actividad trombolítica apreciable, puesto que el peso de los coágulos no se redujo tras el ensayo. Para BM2 el peso de los coágulos se redujo entre un 14 y 11% y en el caso de SL, el peso se redujo, en uno solo de los duplicados, más de un 13%. De estos resultados se deduce que BM2 es la cepa con mayor actividad trombolítica y/o fibrinolítica.

4. Discusión

Los medios selectivos utilizados en este artículo fueron efectivos en términos de aislar las bacterias productoras de proteasas como se ve en el crecimiento sobre la gelatina y la caseína en las pruebas *in plate*. Sin embargo, para la detección de la actividad gelatinasa, fue más útil en el ensayo en tubo, pinchando colonias y observando licuefacción, que detectando el halo de degradación de la gelatina en placa Petri (resumido en **tabla 5**). La falta de este indicador visual sugirió que BM2 y SL (**fig. 3 y 4**), las cepas en las que menos se aprecia el halo de degradación, pueden necesitar más tiempo de incubación o una dosis diferente de concentración de peptona como sustrato o incluso otro rango de temperatura de incubación. Con respecto a estos tres elementos, la temperatura podría ser un factor determinante según lo informado por Soundra (Soundra Josephine et al., 2012) en términos de actividad proteasa, ya que reportó que 40°C es el óptimo para *B. anthracis* y *B. cereus*. Foysal (Foysal & Lisa, 2018) va aún más lejos al presentar un rango de temperaturas óptimas entre 45°C a 55°C para sus 11 aislados de *Bacillus*. Por eso, creemos que se deben repetir ensayos en un rango más amplio de temperaturas a los pH ensayados en este trabajo.

Tabla 5. Resultados de los tres ensayos para caracterización proteolítica bacteriana

Aislados	Gelatinasa <i>in plate</i>	Gelatinasa <i>in vitro</i>	Caseinasa <i>in plate</i>
BM1	*pH 7	*pH 7	pH 7
BM2	*pH 9	*pH 9	pH 7
SL	No se observa	*pH 9	pH 7

Los asteriscos indican el pH al que se obtuvo mayor actividad.

Por su parte, *B. megaterium* se encuentra entre las bacterias más grandes del medio ambiente y, según los informes, prefiere grandes concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno y un pH neutro ligeramente alcalino, aunque también ha mostrado resistencia a ambientes ácidos, y actividad gelatinasa a pHs 5 y 5,5 (Andriani et al., 2017; Freedman et al., 2018; Kumar Sura & Hiremath, 2019; Balan et al., 2012). Esto es consistente con los resultados presentados (**fig. 2 y 3**) ya que las muestras mostraron crecimiento en pH 9 y 7 pero no tanto en pH 5 como se indicó anteriormente.

Se ha informado que *S. liquefaciens* crece de manera óptima en un pH entre 5 y 10, con una clara inclinación a 8 y ninguna actividad más allá de 10, y un intervalo muy corto de temperatura, entre 35-40°C, aunque puede permanecer activo en temperaturas tan elevadas como 60°C (Baglinière et al., 2017). Una vez más, los resultados son consistentes con los presentados en este trabajo (**fig. 4**). En cuanto a la capacidad de hidrolizar caseína, los reportes por otros autores indican actividad hidrolítica a pH 7 (Aryal Sagar, 2022; Padmapriya & Christudhas Williams, 2012; Rafii, 2014), concordando también con los resultados presentados.

La base de datos MEROPS (base de datos de peptidasas) presenta al menos seis estudios que respaldan a *B. megaterium* como bacteria productora de proteasas y solo uno para *S. liquefaciens* (EMBL-EBI, 2017), lo que hace de *B. megaterium* una fuente bien establecida y confiable de proteasas. Por su parte, *S. liquefaciens* requeriría de estudios adicionales y caracterizaciones en relación a este tema para demostrar en mayor profundidad su potencial como fuente de proteasas para distintas aplicaciones.

En relación a la actividad caseinasa *in vitro*, estudios similares al nuestro, empleando el mismo método (Folin) reportan las siguientes actividades para el género *Bacillus*: 210,0 U/mL para *B. amyloliquefaciens* (Zhao et al., 2022); aproximadamente 25 U/mL para *B. gibsonii* (Mahakhan et al., 2022); 99,54 U/mL para *B. velezensis* (Liu et al., 2022); aproximadamente 48 U/mL para *B. cereus* (Zhang et al., 2022); y finalmente, 897 U/mg de actividad específica para *B. megaterium* (Manavalan et al., 2020). En cuanto al género *Serratia* se reportan entre 40 y 306 U/mL (Salwan et al., 2020). Sin embargo, la comparación de otros estudios con nuestra actividad caseinasa *in vitro* resulta difícil puesto que, por los motivos expuestos más anteriormente, no pudimos calcular la actividad específica. En nuestro caso, SL fue la muestra con mayor actividad, seguida por BM1.

444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482

El ensayo de lisis de coágulos sanguíneos se ha realizado ampliamente para determinar la actividad enzimática trombolítica (Frías et al., 2021). El uso de sangre total para medir la actividad fibrinolítica tiene ventajas porque las células en la sangre están involucradas tanto en la formación de coágulos como en la fibrinólisis. Sin embargo, almacenar y estandarizar los ensayos de sangre total puede ser un desafío, y los ensayos deben realizarse poco después de la recolección de sangre. Otra limitación es la opacidad de la sangre causada por la hemoglobina, lo que dificulta el uso de ciertos tipos de ensayos (Ilich et al., 2017). Según la **Tabla 4**, BM2 y SL presentaron la capacidad de disolver coágulos sanguíneos en varios porcentajes. BM1 no mostró esta capacidad por lo que podría decirse que es una cepa diferente de BM2. La mayoría de los estudios consultados presentan datos realizados en ensayos directamente con fibrina *in vitro* y otros más sofisticados *in vivo* y *ex vivo* (Elnager et al., 2015; Nikitin et al., 2021), por lo cual no se pueden comparar los resultados de una forma adecuada. *B. subtilis* y *Codium fragile*, muestran actividad lítica de coágulos sanguíneos, al cabo de 24 horas de reacción, del 38,4% y 80% respectivamente (Rajaselvam et al., 2021). Sin embargo, en nuestro ensayo, la poca cantidad de proteína utilizada (124 µg) para disolver los coágulos en conjunto con el hecho de que no se purificó (o semi purificó) la enzima ni se hicieron ensayos para demostrar sus condiciones óptimas como pH, cofactores, etc., demuestra resultados muy prometedores para futuras investigaciones en estas cepas.

Un enfoque para abordar este problema es probar directamente la enzima en placas de fibrina y (Frías et al., 2021) evaluar las áreas de hidrólisis de manera similar al método de caseína y gelatina en *in plate* como se describe en la sección 2.2.3. Desafortunadamente, la fibrina no estaba disponible durante el tiempo del experimento. Para estudios futuros y para proporcionar una prueba más robusta, se recomienda medir la capacidad fibrinolítica global (GFC), que implica usar la muestra de sangre completa y mezclarla con trombina y medir el producto de degradación de fibrina a través de un ensayo inmune enzimático y comparar la cantidad obtenida antes y después del tratamiento (Rich et al., 2008).

La degradación de gelatina, caseína y coágulos de sangre demuestra que estas bacterias son capaces de producir enzimas para cada uno de estos sustratos y podrían ser fuente de tratamientos prometedores contra la trombosis y de otras aplicaciones industriales. Sin embargo, no se sabe con certeza qué enzimas se obtuvieron en estos ensayos ya que se utilizó en todo momento un lisado crudo enzimático y no una enzima purificada por los métodos tradicionales como precipitación con sulfato de amonio, HPLC en sus distintas variantes, precipitación en el punto isoelectrico, etc.

5. Conclusiones

483

- Los medios selectivos empleados sirvieron para aislar cepas con actividad proteolítica: *B. megaterium* y *S. liquefaciens* 484
485
- Los métodos de extracción de proteína no presentan diferencias significativas en cuanto al rendimiento. 486
- De las cepas aisladas, BM2 y SL son las más prometedoras para la búsqueda de proteasas de interés. En el caso particular de enzimas trombolíticas, BM2 es la más prometedora. 487
488
489

6. Recomendaciones y perspectivas futuras

490

- Realizar curvas de crecimiento a diferentes T y pH para afinar las condiciones de crecimiento. 491
492
- Emplear más fuente enzimática en los ensayos *in vitro*. 493
- Determinar la actividad específica por el método de Folin – Ciocalteu empleando estándares de Tyr para poder establecer comparaciones mejores con otros trabajos y para purificar las diferentes actividades proteolíticas. 494
495
496
- Realizar análisis mediante PAGE para conocer peso molecular y para poder identificar la enzima 497
- Medir la capacidad fibrinolítica global 498
499
500
501

Contribución de los Autores: Para artículos de investigación con varios autores, se debe proporcionar un breve párrafo que especifique sus contribuciones individuales. Las siguientes afirmaciones deben usarse: “Conceptualización, X.X. y Y.Y.; metodología, X.X.; software, X.X.; validación, X.X., Y.Y. y Z.Z.; análisis formal, X.X y, X.X.; recursos, X.X.; curaduría de data, X.X.; eescritura—preparación de borrador o draft original, X.X.; escritura—revisión y edición, X.X.; visualización final, X.X.; supervisión, X.X.; administración y gestión de proyecto, X.X.; adquisición de fondos, Y.Y. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.” Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. La autoría debe limitarse a aquellos que hayan contribuido sustancialmente al trabajo informado.

Financiamiento/Fondos: “Esta investigación no recibió financiación externa” o “Esta investigación fue financiada por por la DII-UISEK-P000000” o “Esta investigación fue financiada por NOMBRE DEL FINANCIADOR, número de subvención XXX”, según sea el caso.

Agradecimientos: Me gustaría aprovechar esta oportunidad para expresar mi más sincera gratitud a las siguientes personas y organizaciones, sin las cuales esta tesis no habría sido posible.

En primer lugar, doy gracias a Dios por concederme la fuerza y la perseverancia necesarias para llevar este viaje hasta el final. A mis padres, gracias por su aliento constante, su apoyo inquebrantable y su amor incondicional. Sus sacrificios y dedicación a mi educación han sido la fuerza impulsora de mi éxito. Les estaré eternamente agradecido por creer en mí y por inculcarme los valores del trabajo duro, la determinación y la resistencia. También quiero expresar mi sincera gratitud a la Fundación Assaf por su generoso apoyo financiero durante este último año de mi educación. Su contribución hizo posible que completara mis estudios sin la carga del estrés financiero y me permitió centrarme en mis objetivos académicos. A Antonella y Martin, gracias por su inestimable ayuda y apoyo a lo largo de mi trayectoria investigadora. Su orientación, estímulo y apoyo inquebrantable han sido una fuente de inspiración para mí. Su disponibilidad para compartir sus conocimientos y experiencia ha sido decisiva para moldear la persona y el investigador que soy hoy. Por último, me gustaría dar las gracias a todos aquellos que me han ayudado y apoyado de alguna manera a lo largo de este viaje. Su aliento, sus amables palabras y su apoyo han significado para mí más de lo que las palabras pueden expresar. Gracias por formar parte de mi vida y por ayudarme a alcanzar mis metas académicas.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

7. Referencias citadas

1. Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., & González-Mendoza, D. (2017). Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology*, 45(4), 385-391. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.385>
2. Abdul Rahim, P., & Rengaswamy, D. (2022). Fibrinolytic Enzyme - An Overview. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(11), 1336-1345. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220104143113>
3. Alejandra Karlanian, M., Alejandra Barbaro, L., & Enrique Morisigue, D. (2008). VI ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS MATERIAIS REGIONAIS COMO SUBSTRATO.
4. Ambrus, J. L., Ambrus, C. M., Back, N., Sokal, J. E., & Collins, G. L. (1957). Clinical and experimental studies on fibrinolytic enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 68(1), 97-137. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1957.TB42616.X>
5. Andriani, Y., Rochima, E., Safitri, R., & Rahayuningsih, S. R. (2017). Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* Bacteria as Probiotic Bacteria in Fish and Shrimp Feed. *KnE Life Sciences*, 2(6), 127. <https://doi.org/10.18502/KLS.V2I6.1029>
6. Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22(1), 79-89. <https://doi.org/10.1085/JGP.22.1.79>
7. Baglinière, F., Salgado, R. L., Salgado, C. A., & Vanetti, M. C. D. (2017). Biochemical Characterization of an Extracellular Heat-Stable Protease from *Serratia liquefaciens* Isolated from Raw Milk. *Journal of Food Science*, 82(4), 952-959. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13660>
8. Benchling. (2012). *Sonic Lysis of E. coli for protein extraction*.
9. Bridge, K. I., Philippou, H., & Ariëns, R. A. S. (2014). Clot properties and cardiovascular disease. *Thrombosis and haemostasis*, 112(5), 901-908. <https://doi.org/10.1160/TH14-02-0184>
10. Castro, H. C., Abreu, P. A., Geraldo, R. B., Martins, R. C. A., Dos Santos, R., Loureiro, N. I. V., Cabral, L. M., & Rodrigues, C. R. (2011). Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 165-181. <https://doi.org/10.1002/jmr.1091>
11. CDC, & National Center for Health Statistics. (2023). *Leading Causes of Death*. <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm>
12. Craik, C. S., Page, M. J., & Madison, E. L. (2011). Proteases as therapeutics. En *Biochemical Journal* (Vol. 435, Número 1, pp. 1-16). <https://doi.org/10.1042/BJ20100965>
13. de Souza, P. M., de Assis Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P. C., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Filho, E. X. F., Pessoa Junior, A., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
14. Dela Cruz, T. E. E., Martin, J., & Torres, O. (2016). *Gelatin Hydrolysis Test Protocol*.
15. Diagenode - Innovating Epigenetic Solutions. (2018). *Europe-Diagenode s.a Protein extraction from Tissues and Cultured Cells using Bioruptor® Standard & Plus*.
16. Diwan, D., Usmani, Z., Sharma, M., Nelson, J. W., Thakur, V. K., Christie, G., Molina, G., & Gupta, V. K. (2021). Thrombolytic enzymes of microbial origin: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910468>
17. Drugs.com. (2022). *Anticoagulants What are Anticoagulants?* <https://www.drugs.com/drug-class/anticoagulants.html>

18. Elnager, A., Hassan, R., Idris, Z., Mustafa, Z., Wan-Arfah, N., Sulaiman, S. A., Gan, S. H., & Abdullah, W. Z. (2015). Fibrinolytic activity and dose-dependent effect of incubating human blood clots in caffeic acid phenethyl ester: In vitro assays. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/627471>
19. EMBL-EBI. (2017). *MEROPS - the Peptidase Database*. https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/organism_index?type=p;id=B
20. Fibrinolytic and pholytic enzymes in therapeutics. (1954). *Resenha clinico-cientifica*, 23(4), 133-134. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13186204/>
21. Foysal, M. J., & Lisa, A. K. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 387-392. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.005>
22. Freedman, A. J. E., Peet, K. C., Boock, J. T., Penn, K., Prather, K. L. J., & Thompson, J. R. (2018). Isolation, Development, and Genomic Analysis of *Bacillus megaterium* SR7 for Growth and Metabolite Production Under Supercritical Carbon Dioxide. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2152. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02152/BIBTEX>
23. Frias, J., Toubarro, D., Fraga, A., Botelho, C., Teixeira, J., Pedrosa, J., & Simões, N. (2021). Purification and Characterization of a Thrombolytic Enzyme Produced by a New Strain of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 31(2), 327-337. <https://doi.org/10.4014/jmb.2008.08010>
24. Harish, B. S., & Uppuluri, K. B. (2018). Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1373-1387. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.115>
25. Hirsh, J., Anand, S. S., Halperin, J. L., & Fuster, V. (2001). Mechanism of Action and Pharmacology of Unfractionated Heparin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(7), 1094-1096. <https://doi.org/10.1161/HQ0701.093686>
26. Ilich, A., Bokarev, I., & Key, N. S. (2017). Global assays of fibrinolysis. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39(5), 441-447. <https://doi.org/10.1111/IJLH.12688>
27. INEN. (2020). *Estadísticas Vitales Registro Estadístico de Defunciones*.
28. INNERFIELD, I., SCHWARZ, A., & ANGRIST, A. (1952). Intravenous trypsin: its anticoagulant, fibrinolytic and thrombolytic effects. *Journal of Clinical Investigation*, 31(12), 1049. <https://doi.org/10.1172/JCI102698>
29. Johns Hopkins Lupus Center. (2023). *Anticoagulants*. <https://www.hopkinslupus.org/lupus-treatment/common-medications-conditions/anticoagulants/>
30. Kumar Sura, N., & Hiremath, L. (2019). Isolation of *Bacillus megaterium* and its Commercial Importance. *International Journal of ChemTech Research*, 12(4), 30-36. <https://doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120405>
31. Kwon, Y., & Jewett, M. (2015). *Cell-free lysate (E. coli) preparation with sonication*.
32. Liu, Y., Fu, J., Wang, L., Zhao, Z., Wang, H., Han, S., Sun, X., & Pan, C. (2022). Isolation, identification, and whole-genome sequencing of high-yield protease bacteria from Daqu of ZhangGong Laojiu. *PLoS ONE*, 17(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0264677>
33. Mahakhan, P., PatapeeAphaiso, Srisunthorn, K., Vichitphan, K., Vichitphan, S., Punyauppa-path, S., & Sawaengkaew, J. (2022). Alkaline Protease Production from *Bacillus gibsonii* 6BS15-4 Using Dairy Effluent and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive . *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.2210.10007>
34. Manavalan, T., Manavalan, A., Ramachandran, S., & Heese, K. (2020). Identification of a Novel Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the Detergent and Leather Industry. *Biology*, 9(12), 1-14. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9120472>

35. Manzum, A. A., & Mamun, A. Al. (2018). Isolation of *Bacillus* spp . Bacteria from Soil for Production of Cellulase
Abstract Introduction : Screening and isolation of *Bacillus* spp . *Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 57-61.
36. Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2021). Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 1-12. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03036-Z/METRICS>
37. Maubois, J. L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. En *Le Lait* (Vol. 64, Número 646). <https://hal.science/hal-00929030>
38. Miller D.D. (2001). *Química de Alimentos: Extracción de la caseína y determinación del punto isoeléctrico*.
39. Morris, L. S., Evans, J., & Marchesi, J. R. (2012). A robust plate assay for detection of extracellular microbial protease activity in metagenomic screens and pure cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 144-146. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.006>
40. NHS. (2015). *Functions of blood: clotting*. <https://www.blood.co.uk/news-and-campaigns/the-donor/latest-stories/functions-of-blood-clotting/>
41. NHS. (2021). *Anticoagulant medicines*. <https://www.nhs.uk/conditions/anticoagulants/>
42. Nikitin, D., Choi, S., Mican, J., Toul, M., Ryu, W. S., Damborsky, J., Mikulik, R., & Kim, D. E. (2021). Development and Testing of Thrombolytics in Stroke. *Journal of Stroke*, 23(1), 12-36. <https://doi.org/10.5853/JOS.2020.03349>
43. Owen, C. A. (2006). Serine Proteinases. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00264-7>
44. Palta, S., Saroa, R., & Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), 515. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>
45. Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R. G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 50-55. <https://doi.org/10.1016/J.JTUSCI.2014.04.010>
46. Patel, S., Singh, R., Preuss, C. V., & Patel, N. (2022). Warfarin. *Hemostasis and Thrombosis, Third Edition*, 125-131. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09312-3_25
47. Piran, S., & Schulman, S. (2019). Treatment of bleeding complications in patients on anticoagulant therapy. *Blood*, 133(5), 425-435. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-06-820746>
48. Rajaselvam, J., Benit, N., Alotaibi, S. S., Rathi, M. A., Srigopalram, S., Biji, G. D., & Vijayaraghavan, P. (2021). In vitro fibrinolytic activity of an enzyme purified from *Bacillus amyloliquefaciens* strain KJ10 isolated from soybean paste. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4117. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.04.061>
49. Ramos, J. A., Daniel Vázquez, M., Agentes, M., & Agraria, E. (1975). *LA HIGUERA*.
50. Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.), 160-164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh071>
51. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
52. Rijken, D. C., Hoegge-de Nobel, E., Jie, A. F. H., Atsma, D. E., Schlij, M. J., & Nieuwenhuizen, W. (2008). Development of a new test for the global fibrinolytic capacity in whole blood. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(1), 151-157. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2007.02816.X>
53. Sharma, C., Osmolovskiy, A., & Singh, R. (2021). Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: Production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications. En *Pharmaceutics* (Vol. 13, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>

54. Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech* 2021 11:10, 11(10), 1-25. <https://doi.org/10.1007/S13205-021-02928-Z>
55. Sony, I. S., & Potty, V. P. (2016). Quantitative Estimation of Protease Produced by Bacterial Isolates from Food Processing Industries. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 5(10), 238-244. www.ijert.org
56. Soundra Josephine, F., S, R. V, Devi, N., Babu Ganapa, S., & G, S. K. (2012). Isolation, production and characterization of protease from Bacillus Sp isolated from soil sample. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res*, 2(1), 163-168. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html%5Cnwww.scholarsresearchlibrary.com>
57. Tigabu, B. M., Agide, F. D., Mohraz, M., & Nikfar, S. (2020). Atazanavir / ritonavir versus Lopinavir / ritonavir-based combined antiretroviral therapy (cART) for HIV-1 infection: a systematic review and meta-analysis. *African Health Sciences*, 20(1), 91. <https://doi.org/10.4314/AHS.V20I1.14>
58. Vega-Castaño, S., Ferreira, L., González-Ávila, M., Sánchez-Juanes, F., García-García, M. I., García-Sánchez, J. E., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2012). Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(10), 597-601. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2012.03.002>
59. Velázquez-Martí, B., & Gaibor-Chavez, J. (2017). *Guía cultivos energéticos de Latinoamérica Eucalipto*.
60. Walsh, P. N., & Ahmad, S. S. (2002). Proteases in blood clotting. *Essays in biochemistry*, 38, 95-111. <https://doi.org/10.1042/BSE0380095>
61. Weisel, J. W. (2005). *FIBRINOGEN AND FIBRIN*. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)70008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)70008-X)
62. Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2017). Fibrin Formation, Structure and Properties. *Sub-cellular biochemistry*, 82, 405. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13
63. WHO. (2021). *The top 10 causes of death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
64. Yale Medicine. (2023). *Blood Clots in Veins, Heart and Lungs*. <https://www.yalemedicine.org/conditions/blood-clots-in-veins-heart-and-lungs>
65. Yaron, J. R., Zhang, L., Guo, Q., Haydel, S. E., & Lucas, A. R. (2021). Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 153. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.648947/BIBTEX>
66. Yee, J., & Kaide, C. G. (2019). Emergency Reversal of Anticoagulation. *Western Journal of Emergency Medicine*, 20(5), 770. <https://doi.org/10.5811/WESTJEM.2018.5.38235>
67. Zareh, M., Davis, A., & Henderson, S. (2011). Reversal of Warfarin-Induced Hemorrhage in the Emergency Department. *Western Journal of Emergency Medicine*, 12(4), 386. <https://doi.org/10.5811/WESTJEM.2011.3.2051>
68. Zhang, R. X., Wu, Z. W., Cui, H. Y., Chai, Y. N., Hua, C. W., Wang, P., Li, L., & Yang, T. Y. (2022). Production of surfactant-stable keratinase from Bacillus cereus YQ15 and its application as detergent additive. *BMC Biotechnology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12896-022-00757-3>
69. Zhao, K., Liu, H., Song, W., Wu, J., Gao, C., Guo, L., & Chen, X. (2022). Combinatorial mutagenesis of Bacillus amyloliquefaciens for efficient production of protease. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00130-7>

Anexo 1

696



Figura A10. Incubación enzimática a 37°C en baño maría de los simples

697

698

La **Figura A10** presenta la incubación enzimática de las proteínas extraídas con solución de caseína durante 30 minutos en baño maría a 37°C. El ensayo se realizó por duplicado con un control que tenía 500 µL de agua destilada en lugar de la muestra de proteína.

699

700

701

702

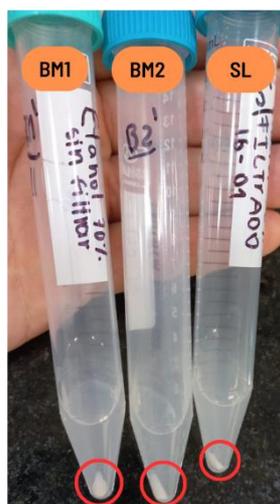


Figura A11. Precipitación de caseína sin reaccionar

703

704

La **figura A11** señala la caseína sin reaccionar después de la incubación durante 30 minutos en baño maría a 37° y la centrifugación a 10000 rpm durante 15 minutos. Solo se recuperó el sobrenadante para continuar con el experimento.

705

706

707

708

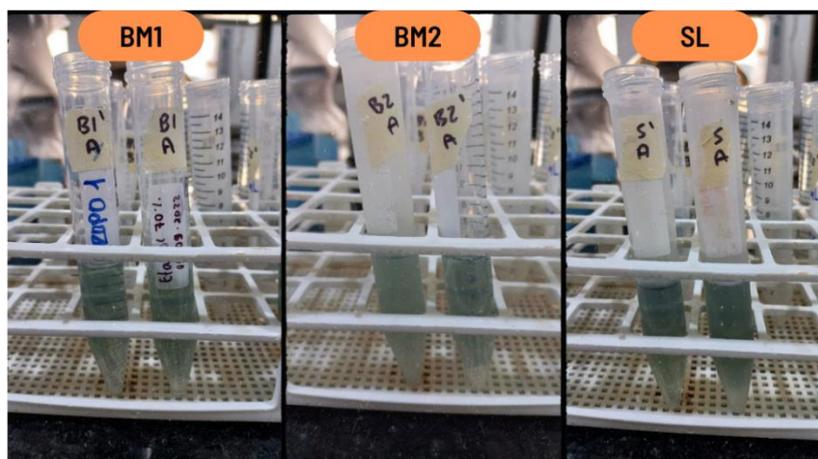


Figura A12. Duplicados de la reacción de Folin-Ciocalteu para todas las muestras

709

710

La **figura A12** muestra la coloración obtenida de la adición del reactivo fenol Folin-Ciocalteu junto con el carbonato de sodio siguiendo el método descrito

711

712