

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales

Aislamiento y selección de bacterias proteolíticas asociadas al proceso de compostaje de residuos hortícolas

Alumno:

Luis Martínez Casado

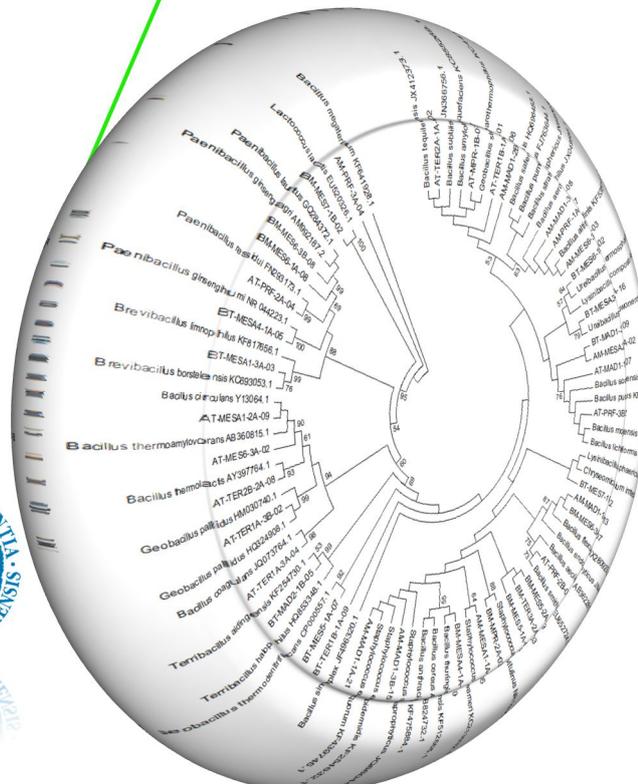
Directores:

María del Carmen Vargas

Joaquín Moreno Casco

Julio 2015

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

AGRADECIMIENTOS

Tras terminar mis estudios como biólogo en la Universidad de León, se abrió ante mí un amplio horizonte de oportunidades. Entre todas las opciones, opté, como *Lucy* eligió cargar con su hijo en brazos y adentrarse en la sabana buscando un futuro mejor, por salir y conocer nuevas ciudades y costumbres. Y así, fue como la Universidad de Almería me acogió como uno más para realizar el Máster.

Máster en el que conocí a dos profesoras que aún aumentaron más mi pasión por la Microbiología y con las que me animé a realizar el presente Trabajo de Fin de Máster. Gracias a la Dra. María José López por sus consejos, y por tratar de conseguir que el trabajo saliera adelante, por enseñarme el gran mundo microscópico escondido a mis ojos. Gracias a la Dra. María del Carmen Vargas por su perseverancia, paciencia, conocimientos y su particular humor, y por las tantas mañanas en las que me aconsejaba y me orientaba para continuar siempre adelante, teniendo en cuenta el pasado. Con ellas comprendí la frase: *“El pasado es un prólogo, la verdadera historia comienza ahora.”* (William Shakespeare), animándome a continuar en este singular mundo.

Quisiera agradecer también a los compañeros de laboratorio, y su maravilloso tiempo, por sus consejos, sus conocimientos, sus palabras de aliento y ánimo. A todos y cada una de las personas que en ese espacio conocí, gracias.

No puedo olvidarme de los compañeros de clase, con ellos he vivido grandes momentos, que han ayudado a seguir formándome como persona. Gracias, a los que además de compañeros os habéis convertido en amigos, por la acogida y no hacerme sentir extraño en vuestra tierra, por todo lo que me habéis enseñado. Y a ti, Julián, primero un desconocido, luego un verdadero amigo, nunca olvidare cada segundo vivido.

Finalmente, toca agradecer a los amigos, a los de siempre, a los de la carrera, a los que seguimos en contacto aunque vivimos repartido por el mundo: gracias por aguantarme todas las conversaciones electrónicas, de teléfono... Gracias. También me siento orgulloso y agradezco que me hayáis dado la mayor oportunidad y facilidad para que hiciera lo que me gustaba, si... a mis padres, a mi hermana, por su apoyo y cariño incondicional, muchas gracias. Eternamente agradecido.

“Podemos ver poco del futuro, pero lo suficiente para darnos cuenta de que queda mucho por hacer.”

Alan Turing

ÍNDICE

1. Resumen	Pág. 1
2. Introducción	Pág. 2
3. Material y métodos	Pág. 7
3.1 Microorganismos proteolíticos en compost	Pág. 7
3.2 Identificación de los aislados proteolíticos	Pág. 9
3.3 Producción y cuantificación de proteasas	Pág. 11
3.4 Concentración del extracto enzimático	Pág. 13
3.5 Cuantificación de proteínas totales	Pág. 14
3.6 Procesado analítico de los datos	Pág. 14
4. Resultados y discusión	Pág. 15
4.1 Aspectos generales de las Comunidad proteolítica	Pág. 16
4.2 Comunidad proteolítica: Filo Actinobacteria	Pág. 17
4.3 Comunidad proteolítica: Filo Firmicutes	Pág. 22
4.4 Comunidad proteolítica: Filo Proteobacterias	Pág. 26
4.5 Comunidad proteolítica: Especies no identificadas	Pág. 28
4.6 Selección y purificación	Pág. 30
5. Conclusiones	Pág. 31
6. Bibliografía	Pág. 33
7. Anexos	Pág. 36

1. RESUMEN

Las proteasas acaparan más del 60% del mercado mundial de enzimas. Dentro de ellas, las de origen microbiano, conforman el grueso de los productos comercializados. Esta preponderancia propicia la existencia de programas de búsqueda y selección que proporcionen nuevos microorganismos productores o enzimas con nuevas y mejoradas prestaciones. En tales programas, la elección del hábitat sobre el que se va ejecutar el protocolo se muestra como vital a la hora de garantizar su éxito. Uno de los hábitats más adecuados para la selección de especies microbianas de interés aplicado lo ofrecen las pilas de compostaje.

El presente Trabajo Fin de Máster dio lugar a una colección de 168 especies proteolíticas, distribuidas entre los Filos Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, con presencia además de 49 aislados no identificados. Aunque la consideración global de los resultados no generó grandes diferencias entre los grupos taxonómicos establecidos, las especies con mejores prestaciones se localizaron en el Filo Firmicutes, con un papel destacado de los géneros evolutivamente cercanos a *Bacillus* (*Geobacillus*, *Lysinibacillus*, etc.). Los resultados obtenidos tras la aplicación de un tratamiento de concentración de los extractos enzimáticos pertenecientes a los cinco aislados con mayores niveles de actividad, apuntan a una posible naturaleza metaloproteica de algunas de las proteasas sintetizadas.

Otro aspecto de interés residió en el aislamiento de microorganismos con escaso reconocimiento en cuanto a capacidad proteolítica, como es el de las actinobacterias pertenecientes a los géneros *Haloglycomices*, *Jonesia*, *Salinibacterium* y *Tsukamurella* o las proteobacterias *Thermovum composti*, *Pseudomonas xanthomarina* y *Psychrobacter celer*.

2. INTRODUCCIÓN

Las últimas décadas han sido testigo de un desarrollo sin precedentes de la sociedad. Múltiples avances tecnológicos han permitido incrementar de forma exponencial la disponibilidad de productos, servicios y metodologías que inciden positivamente sobre el estado de bienestar. Uno de los campos en los que el crecimiento del conocimiento ha sido más acentuado y, por tanto, la mejora de los procesos con él relacionados, ha sido el de la biotecnología. Diversos sectores se han beneficiado de los descubrimientos y del desarrollo de nuevas tecnologías, lo que se ha traducido en la implementación de nuevos protocolos que han permitido la obtención de nuevos productos o la mejora de los ya existentes, tanto en lo que se refiere a sus características finales como a la optimización de los procesos mediante los cuales son generados. Un ejemplo que ilustra nítidamente este hecho se puede encontrar en las enzimas. Desde tiempos inmemoriales, las enzimas han propiciado la obtención de múltiples productos útiles para el ser humano. Culturas como la egipcia hacían uso de estos biocatalizadores, obviamente de forma inconsciente, tal y como se pone de manifiesto en la *Iliada*, en la que se hace referencia a la utilización del estómago de una cabra en la producción de queso. Desde esas lejanas épocas, la aplicación industrial de enzimas no sólo ha dejado de ser un misterio, sino que se ha convertido en una herramienta básica en múltiples sectores comerciales, desbancando en muchas ocasiones procesos químicos más tradicionales y competitivos desde una perspectiva económica, gracias a las mejoras derivadas del desarrollo biotecnológico.

Entre las enzimas más destacadas se encuentran las proteasas. De hecho, en la actualidad, este tipo de biocatalizadores suponen aproximadamente el 60% del mercado global de enzimas (Sawant y Nagendran, 2014), siendo aplicadas en sectores tan diversos como el terapéutico, el farmacéutico o el alimentario, además de participar de forma importante en la producción de detergentes o en el procesado de pieles en la industria textil (Chanalia *et al.*, 2011; Craik *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2008; Senthilvelan *et al.*, 2012; Tavano, 2013). La posición preferente que ostentan y la importancia económica que eso conlleva han potenciado la

investigación de este tipo de enzimas, buscando nuevos organismos productores o moléculas con mejores prestaciones. Los cada vez más evidentes inconvenientes que presentan los procesos químicos, tales como la demanda de condiciones extremas, la existencia de reacciones colaterales, la reducción de la calidad nutricional del producto final o la inespecificidad de los procesos hidrolíticos (Tavano *et al.*, 2013) contribuyen también a promover la búsqueda de sistemas que propicien tratamientos con mayor grado de eficiencia y menos aspectos negativos.

Tabla 1. Aplicaciones comerciales de las enzimas proteolíticas (Adaptado de Kumar *et al.*, 2008).

Sector Industrial	Proteasa	Funcionalidad
<i>Sector panadero</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas neutras 	<ul style="list-style-type: none"> • Acondicionador de la masa panaria
<i>Producción de bebidas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Papaina 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de turbidez • Prevención de turbidez a bajas temperaturas
<i>Sector lácteo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas fúngicas • Quimosina • Otras proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Sustitución de la renina animal • Procesado del suero proteico • Producción de quesos modificados enzimáticamente
<i>Detergentes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas alcalinas • Subtilisina 	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de componentes proteicos
<i>Procesado de alimentos</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiples proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación de sustratos proteicos
<i>Carne y pescado</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tripsina 	<ul style="list-style-type: none"> • Enternecimiento de la carne • Recuperación de nutrientes proteicos a partir de residuos
<i>Edulcorantes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Termolisina 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis inversa en la síntesis de aspartamo
<i>Procesado de pieles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tripsina • Otras proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de pelo • Acondicionamiento de la piel
<i>Medicina</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tripsina 	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de tejidos muertos • Disolución de coágulos sanguíneos
<i>Fotografía</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiples proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperación de plata

En relación con su origen, las proteasas son generadas, tanto por organismos de carácter animal y vegetal como microbiano. Animales y plantas no permiten generar las cantidades demandadas por la industria, además que son las producidas por especies microbianas las que presentan características más favorables. Tal hecho se debe a una serie de factores, entre los que se incluyen la elevada tasa de crecimiento de los microorganismos, lo que se traduce en una mayor productividad, la mayor facilidad para la manipulación genética, la independencia de factores estacionales de los procesos de producción, la menor complejidad de las matrices en la que se encuentra la enzima, lo que se traduce en procesos de purificación más sencillos y económicos, o la posibilidad de generar enzima de forma ininterrumpida y con un elevado grado de homogeneidad (Saxena, 2015). Adicionalmente, presentan una mayor versatilidad metabólica, lo que, junto a las características anteriormente citadas, propician que el 59% de las enzimas comercializadas sean proteasas de origen microbiano (Chu, 2007). De acuerdo con la universalidad de su función, las proteasas son producidas por todo tipo de microorganismos, si bien son las bacterianas las que de forma mayoritaria acaparan el mercado (Olajuyigbe y Alele, 2005), tanto por la mayor capacidad productiva de los procariontes como por los superiores niveles de actividad de las enzimas (Subba Rao *et al.*, 2009).

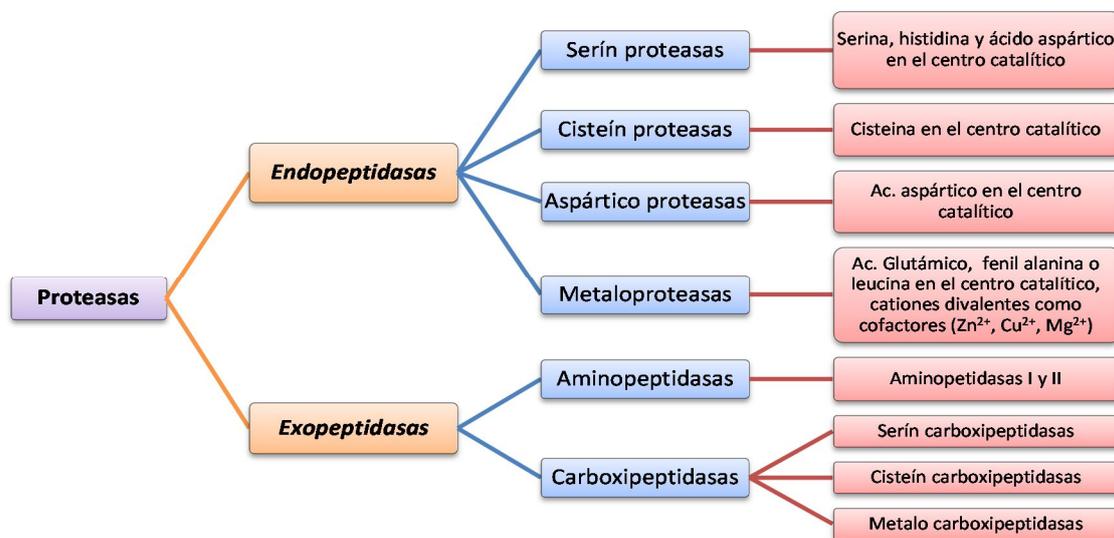


Figura 1. Tipos de proteasas (adaptado de Kumar et al., 2008).

De acuerdo con la Comisión de Enzimas, las proteasas quedan encuadradas dentro del grupo 3 (hidrolasas), subgrupo 4 (hidrolasas de enlaces peptídicos). Inicialmente, se establecen dos grupos principales de enzimas proteolíticas, exo y endopeptidasas, dependiendo de que los enlaces sobre los que actúan se localicen en zonas terminales o internas de la molécula. Desde un punto de vista económico, las segundas son considerablemente más importantes, ya que son escasas las exopeptidasas que muestran funcionalidad comercial (Sumantha *et al.*, 2006). En estas, además, se diferencia entre amino y carboxipeptidasas según rompan el enlace por la parte amínica o la carboxílica.

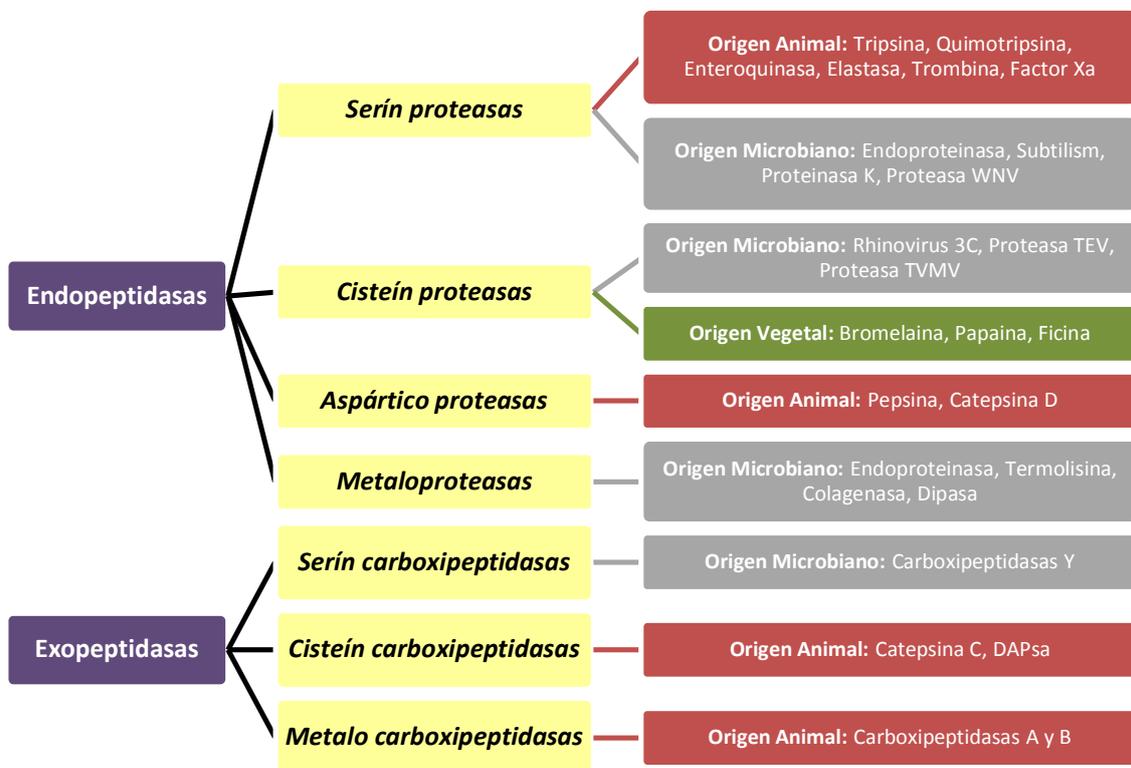


Figura 2. Origen de algunas proteasas comerciales (adaptado de Sawant y Sarawasthy, 2014).

Desde otra perspectiva, las enzimas proteolíticas se clasifican de acuerdo con las características de su centro activo y, de forma, más concreta, en función de la presencia de determinados aminoácidos. Así, se habla de serín, cisteín, aspártico y metalopeptidasas, a las que recientemente se han añadido las treonin peptidasas (Wu y Chen, 2011). Según su

distribución en el conjunto de organismos vivos, las metaloproteínas constituyen el grupo más habitual, con un 34% del total, mientras que serín y cisteín proteasas alcanzan respectivamente el 30% y el 26%. Treonin y aspártico peptidasas suponen el 5% y el 4% del total (Theron y Divol, 2014). Finalmente, una última diferenciación se fundamenta en el rango de pH óptimo de actuación, según la cual se distingue entre proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Las primeras se asocian mayoritariamente a especies fúngicas, mientras que las segundas proceden en un elevado porcentaje de plantas (Alnahdi, 2012). En la actualidad, y gracias a los nuevos conocimientos adquiridos mediante la aplicación de nuevas y sofisticadas tecnologías, empiezan a cobrar protagonismo otro tipo de criterios a la hora de diferenciar tipos de proteasas. En relación con estos nuevos criterios y otros aspectos de importancia, se puede consultar en internet la completa base de datos focalizada en las enzimas proteolíticas: MEROPS (merops.sanger.ac.uk).

La importancia de las proteasas, con todo lo expuesto hasta ahora, queda claramente establecida. Así, la búsqueda y selección de peptidasas con propiedades mejoradas o diferenciadoras aún se postula como un campo de enorme atractivo. En este sentido, y aunque en los últimos años han proliferado las estrategias centradas en el escrutinio de metagenomas, los tradicionales protocolos basados en el aislamiento de especies microbianas portadoras de las actividades deseadas continúan siendo una opción válida (Sasha y Dhanasekaran, 2010; Kim *et al.*, 2012; Loperena *et al.*, 2012). Sea cual sea la vía seleccionada, molecular o cultivar, la correcta elección del entorno en el que se va a realizar la búsqueda marca en gran medida el éxito del proceso. En este sentido, hábitats con características diferenciadoras pueden propiciar la presencia de especies microbianas con propiedades especiales y sistemas enzimáticos con propiedades diferenciadoras. La pila de compostaje se ajusta a estas demandas, ya que en ella coexisten diversos microhábitats, tanto espacial como cronológicamente, en los que la comunidad microbiana ha de adaptarse a muy diversas condiciones relacionadas con la temperatura, la atmósfera gaseosa, el pH y los componentes nutricionales. No resulta, por tanto, descabellado pensar que un determinado porcentaje de esa población sea portador de enzimas de

interés aplicado y con propiedades diferenciadoras. Así, el presente Trabajo Fin de Máster se plantea como objetivo principal el escrutinio de la microbiota bacteriana asociada al compostaje de residuos hortícolas en cuanto a su capacidad proteolítica, tanto desde una perspectiva cualitativa como cuantitativa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS EN COMPOST

La colección de microorganismos proteolíticos obtenida en el presente trabajo se obtuvo a partir de los aislados bacterianos procedentes de un proceso de compostaje realizado con restos de plantas de tomate y astillas de pino convenientemente trituradas y mezcladas a partes iguales (p/p), propiciando así un valor adecuado de la relación C/N (25-30). Con este material de partida, se constituyeron tres pilas (1,0 m x 1,5 m x 1,2 m; ancho x largo x alto) a las que se incorporó el volumen de agua necesario para alcanzar una humedad en torno al 50%. A lo largo del proceso, las pilas fueron aireadas regularmente (régimen basal de 7,5-9,0 L kg⁻¹ cada 4 h) y volteadas quincenalmente, con objeto de asegurar niveles de oxígeno no limitantes y favorecer la mezcla de nutrientes. Adicionalmente, durante las operaciones de volteo se corrigió el valor de humedad siempre que fue necesario.

Durante el desarrollo del proceso se extrajeron un total de 19 muestras representativas de las diversas etapas que conforman el proceso, considerando tanto criterios de carácter térmico como cronológico, además de aspectos referentes a la naturaleza de las transformaciones dominantes. Las muestras se constituyeron mezclando material procedente de 9 puntos distintos de la pila, seleccionados de forma

que, de forma global, fuesen representativos de las diversas condiciones térmicas y dimensionales que se pueden encontrar en una pila de compostaje (Tabla 2). Las muestras obtenidas fueron suspendidas en una proporción de 1/10 (p/V) en solución salina estéril (NaCl, 0,9%, p/V) y mantenidas en agitación (250 rpm) durante 30 min para garantizar representatividad. Posteriormente, esta suspensión inicial fue diluida decimalmente. A partir de las diluciones adecuadas se sembraron placas con medio APHA (Cultimed, Barcelona) y SCA (Difco, USA) para la selección de bacteria y actinobacterias, respectivamente. Sendas réplicas fueron incubadas a 30 °C y 50 °C para el crecimiento de especies mesófilas y termófilas. Tras el adecuado periodo de incubación, 24-48 h en el caso de bacterias y 120 h en el de actinobacterias, se procedió al recuento y aislamiento de todos los morfotipos diferentes detectados.

Tabla 2. Muestreos realizados durante las diversas etapas del proceso.

Fase del proceso	Muestra	Día de proceso
<i>Ambiente en Materias Primas</i>	MPR	0
<i>Mesofílica en Ascenso</i>	MESA1	1
<i>Termofílica</i>	TER1A	2
<i>Termofílica</i>	TER1B	5
<i>Mesofílica en Descenso</i>	MESD1	7
<i>Mesofílica en Ascenso</i>	MESA2	8
<i>Termofílica</i>	TER2A	9
<i>Termofílica</i>	TER2B	12
<i>Mesofílica en Descenso</i>	MESD2	14
<i>Mesofílica en Ascenso</i>	MESA3	15
<i>Termofílica</i>	TER3A	16
<i>Mesofílica en Descenso</i>	MESD3	26
<i>Mesofílica en Ascenso</i>	MESA4	28
<i>Mesofílica</i>	MES5	42
<i>Mesofílica</i>	MES6	56
<i>Mesofílica</i>	MES7	63
<i>Ambiente en Maduración</i>	MAD1	119
<i>Ambiente en Maduración</i>	MAD2	168
<i>Ambiente en Producto Final</i>	PRF	189

La colección microbiana obtenida fue cualitativamente ensayada en relación con su capacidad proteolítica, generando así la colección de especies capaces de hidrolizar proteínas. El ensayo se llevó a cabo mediante siembras de cada uno de los aislados en medios en placa Petri conteniendo leche descremada, y posterior visualización de la capacidad proteolítica por la aparición de un halo de aclaramiento alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo como consecuencia de la hidrólisis de las proteínas, que confieren al medio un aspecto opaco debido a su insolubilidad (Saran *et al.*, 2007).

Los aislados pertenecientes a la colección proteolítica fueron conservados a corto plazo en tubos de Agar inclinado de APHA y a largo plazo mediante sistemas de crioconservación Cryoinstant (Deltalab, Barcelona).

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS PROTEOLÍTICOS

Los componentes de la colección de cepas proteolíticas fueron identificados mediante secuenciación del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal. Dicha secuenciación se realizó a partir de los productos de PCR generados tras la amplificación con los cebadores 27F (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) del ADN procedente de una suspensión celular sometida a un tratamiento de choque térmico (97 °C durante 5 min, seguidos de 5 min a 0 °C), que propició la rotura de las cubiertas celulares y, por tanto, la liberación del ADN. Las suspensiones celulares fueron obtenidas mediante la incorporación de la biomasa microbiana procedente de un cultivo puro a 500 µL de agua miliQ estéril. El programa de amplificación aplicado constó de una etapa inicial de desnaturalización (5 min a 95 °C), 30 ciclos constituidos por tres etapas de desnaturalización, alineamiento y

elongación (60 s a 94 °C, 60 s a 55 °C y 90 s a 72 °C, respectivamente), y una etapa de elongación final (10 min a 72 °C).

Los productos de amplificación (verificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tampón SB 1X y carrera a 100 V durante 70 min) fueron limpiados (Diffinity Rapid Tip®, Sigma-Aldrich, EE.UU), cuantificados (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, EE.UU) y ajustados en su concentración a valores de ADN en torno a 25 ng μL^{-1} . Los productos así tratados fueron remitidos a los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería, donde fueron analizados por el Servicio de Análisis de Ácidos Nucleicos. El procesado de las secuencias fue realizado mediante la aplicación de los siguientes programas y bases de datos:

- Sequence Scanner v1.0 (www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html), para el procesado inicial de las secuencias.
- Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), para la obtención de la secuencia reversa complementaria del fragmento procedente de la amplificación con el cebador reverso.
- ClustalX2 v2.0.113 (<http://www.clustal.org/>), para la realización de alineamientos.
- Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>), para la edición y corrección de las secuencias.
- Base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para la comparación de los fragmentos obtenidos a través de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3. PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEASAS

Los aislados bacterianos que mostraron actividad proteolítica en el ensayo cualitativo fueron sometidos a un estudio de cuantificación. Dicho estudio se planteó en tres fases diferenciadas (producción, reacción enzimática y cuantificación de producto de reacción) con objeto de favorecer la logística y automatización del protocolo.

Fase I. Producción de enzimas proteolíticas: Cada una de las bacterias proteolíticas fue ensayada por triplicado, utilizando para ello el medio de producción detallado en la Tabla 3. El ensayo se llevó a cabo en frascos ISO de 100 mL adicionados con 20 mL de medio estéril. La inoculación se realizó con 1 mL de suspensión bacteriana de concentración aproximada a $3 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹, ajustada mediante escala de MacFarland. La suspensión se obtuvo con biomasa procedente de un cultivo puro crecido en Agar Nutritivo durante 28-48 h a 30 °C/50 °C, en función de que el aislado procediese del programa mesófilo o del termófilo. En el caso de actinobacterias incrustadas en el medio, la inoculación se efectuó con fragmentos de 1 cm² Ø extraídos en condiciones asépticas de placas de Agar Nutritivo incubadas durante 120 h a la temperatura adecuada. La incubación se realizó en agitación (100 rpm) y durante 48 h, en el caso de bacterias, y en estático durante 148 h en el de actinobacterias incrustadas.

Finalizado el periodo de incubación, se verificó la ausencia de contaminaciones mediante siembra en placa de Agar Nutritivo, y se procedió a la obtención del extracto acelular a través de técnicas de centrifugación (Digicen 20-R, Orto Alresa, Madrid, España). Las condiciones de centrifugación fueron las siguientes: 10000 rpm durante 10 min y a 4 °C. En todos los casos, los extractos fueron conservados a -20 °C hasta la realización de la reacción enzimática.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo empleado en la Fase de Producción.

Componente	Concentración
<i>Peptona de caseína</i>	5,00 g L ⁻¹
<i>Extracto de malta</i>	3,00 g L ⁻¹
<i>Extracto de levadura</i>	3,00 g L ⁻¹
<i>Solución A de Sales de Janshekar*</i>	100 mL
K ₂ HPO ₄	16,00 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	5,00 g L ⁻¹
<i>Solución B de Sales de Janshekar*</i>	100 mL
NaCl	2,50 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,80 g L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,13 g L ⁻¹
<i>Solución B de Sales de Janshekar*</i>	100 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	12,50 g L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	10,00 g L ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	25,00 g L ⁻¹

*Janshekar *et al.*, 1982

Fase II. Reacción enzimática: Para el desarrollo de la actividad proteolítica se siguió el protocolo descrito por Geok *et al.* (2003), según el cual 100 µL del extracto enzimático y 500 µL del sustrato (caseinato sódico al 0,65% en p/v disuelto en tampón fosfato pH 7,5) fueron incubados en agitación (80 rpm) durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la incorporación de 500 µL de ácido tricloroacético 0,11 M (TCA) y la aplicación de hielo. En cada tanda de reacción se incorporaron sendos controles, uno positivo y otro denominado control problema. El primero, cuya finalidad residió en la verificación del protocolo, se realizó sustituyendo el extracto acelular por proteasa comercial de *Bacillus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). El segundo, incorporado con objeto de cuantificar contribuciones a la concentración de producto de reacción diferentes a las estrictamente derivadas de la actividad proteolítica durante el desarrollo de la reacción enzimática, incorporó el TCA de forma previa al periodo de reacción. En todos los casos, el medio de reacción se clarificó mediante centrifugación

(10 min a 10000 rpm y 4 °C). Los productos de reacción se conservaron a -20 °C hasta su cuantificación.

Fase III. Cuantificación de la actividad: El producto de reacción generado como consecuencia de la actividad asociada a los extractos enzimáticos fue cuantificado mediante métodos espectrofotométricos, de acuerdo al protocolo descrito por Geok *et al.* (2003). La técnica se fundamenta en el desarrollo de reacciones redox entre los grupos fenólicos presentes en determinados aminoácidos (principalmente tirosina y triptófano) y el reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, que propicia un cambio de color en este último, pasando del amarillo de la forma oxidada al azul de la forma reducida. Para propiciar la formación de dichos compuestos cuantificables, se mezclaron en microplacas de análisis 50 µL de extracto enzimático con 25 µL del reactivo Folin-Ciocalteu de concentración 0,5 N y en condiciones básicas (125 µL de carbonato sódico 0,5 M). Tras 30 min, el color azul desarrollado fue medido a 660 nm (Eon™, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU) y referenciado en relación con los valores de absorbancia generados por patrones de tirosina (Fluka, St. Gallen, Suiza) de concentración variable entre 3,125 µg mL⁻¹ y 200 µg mL⁻¹.

3.4. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Tras el ensayo cualitativo, se realizó un nuevo estudio en el que se incluyeron los cinco aislados que generaron los mejores resultados y sobre los que se realizó un tratamiento de purificación. Para ello, dichos microorganismos fueron cultivados en las condiciones descritas en el epígrafe anterior, ampliando el volumen de cultivo hasta los 500 mL. Finalizado el periodo de incubación, el medio de producción fue purificado y concentrado hasta un volumen final aproximado de 40 mL, empleando

para ello un sistema de ultrafiltración Pellicon Millipore Ultracel PLCGC (Darmstadt, Alemania), dotado de una membrana con tamaño de poro de 10 kDa y acoplado a un sistema de bombeo Heidolph Pumpdrive 5201 (Schwabach, Alemania).

En todos los extractos concentrados se determinó el nivel de actividad enzimática siguiendo el protocolo detallado en el epígrafe anterior, tanto en lo que respecta al desarrollo de la reacción enzimática como a la cuantificación del producto de reacción.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Los extractos acelulares fueron analizados en relación con la presencia de proteínas totales, con objeto de calcular la actividad específica. Para ello, se utilizó el método de Bradford, cuya reacción de diagnóstico se basa en el cambio de tonalidad del colorante Coomassie Azul Brillante G-250 cuando se une a proteínas (Bradford, 1976). Al igual que en protocolo de cuantificación de la actividad proteolítica, el ensayo se llevó a cabo en microplaca, a partir de la mezcla de 150 μL de extracto acelular y 150 μL de colorante. El color azul desarrollado es estable en un periodo comprendido entre 5 y 60 minutos posteriores a la mezcla y cuantificable a una λ de 995 nm (EonTM, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU). En todos los casos la concentración se estimó utilizando seroalbúmina bovina (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU) como patrón, a concentraciones comprendidas entre 125 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6. PROCESADO Y ANÁLISIS DE DATOS

Las secuencias genéticas generadas a partir de los productos de PCR fueron taxonómicamente analizadas mediante la herramienta Classifier disponible en la base de datos Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), que

permite asignar niveles taxónomicos en la identificación de especies microbianas a partir de secuencias del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal (Wang *et al.*, 2007). La totalidad de las secuencias fueron también analizadas filogenéticamente mediante el programa Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013) para el establecimiento de relaciones evolutivas entre ellas. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos a partir del método Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA), en conjunción con el método bootstrap (1000 réplicas) para la realización del test de filogenia.

Adicionalmente, los datos generados en relación con la actividad proteolítica analizados estadísticamente a través del programa Statgraphics Centurion XVI.II (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, Estados Unidos). En todos los casos, se estudió la existencia de influencia significativa en los niveles de actividad exhibida como consecuencia de la identidad taxonómica y de la repetición analítica mediante Análisis de Varianza y la formación de grupos de homogeneidad entre aislados, de acuerdo con los niveles de actividad proteolítica desarrollada a partir de la aplicación de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS). En ambos casos, se estableció un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos con respecto a la capacidad proteolítica de la microbiota procariota asociada al proceso de compostaje de residuos hortícolas. Con objeto de facilitar la gestión y comprensión de los datos, esta sección se estructurará de acuerdo con los grupos taxonómicos principales establecidos en la identificación de los aislados, incluyendo además un apartado inicial dedicado a

aspectos generales, y otro final relacionado con la selección de los aislados más destacados. Se concluirá realizando una revisión global que permita obtener una visión conjunta de los resultados obtenidos.

4.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS COMUNIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica estuvo ampliamente representada en la comunidad procariota procedente del proceso de compostaje de residuos hortícolas. Así se deduce del elevado porcentaje de aislados que exhibieron esta capacidad, ya que del total de 245 especies diferentes aisladas, 168 fueron capaces de hidrolizar proteínas, es decir, más del 68%.

Un total de 119 aislados proteolíticos fueron identificados, es decir, algo más del

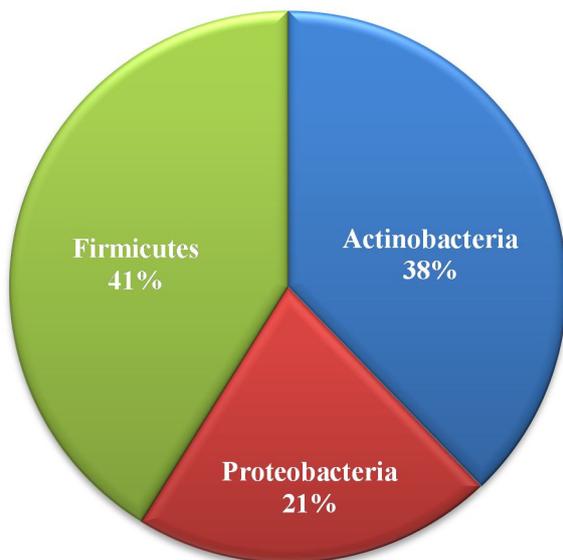


Figura 3. Distribución taxonómica de los aislados proteolíticos identificados.

70% de la comunidad procariota proteolítica. Los restantes aislados no generaron secuencias con la calidad necesaria para permitir una identificación de garantía. Tal hecho puede ser consecuencia de la falta de pureza del cultivo a partir del cual se realizó la extracción de ADN (Mignard y Flandrois, 2006), aunque el número de intentos realizados permitiría desechar esta opción.

Más plausible podría resultar el hecho de que algunos grupos bacterianos no son bien identificados mediante el gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal (Woo *et al.*, 2008), dado que, a pesar del elevado grado de eficacia de los cebadores asociados a este gen, no son válidos en el 100% de los casos (Baker *et al.*, 2003).

Las especies identificadas quedaron agrupadas en tres filos: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, aunque la distribución no fue equitativa. Así, Firmicutes y Actinobacteria dominaron la comunidad proteolítica asociada al compostaje de residuos hortícolas, con casi el 80% de los aislados identificados (Figura 3) y una ligera superioridad de las especies pertenecientes al primer filo. Dado que las especies pertenecientes a estos filos son las más habitualmente detectadas en compost, especialmente Firmicutes (Vaz-Moreira *et al.*, 2008), no es de extrañar que también sean mayoritarias entre la comunidad proteolítica, tal y como también confirman los resultados obtenidos por Ohnishi *et al.* (2011).

4.2. COMUNIDAD PROTEOLÍTICA: FILO ACTINOBACTERIA

La comunidad proteolítica integrada en el Filo Actinobacteria quedó constituida por 45 especies, entre las que dominaron aquellas pertenecientes a los géneros *Brevibacterium*, *Rhodococcus* y, sobre todo, *Microbacterium* (Figura 4). Un amplio porcentaje de actinobacterias son productoras de proteasas, siendo habitualmente empleadas especies de *Streptomyces* a nivel industrial, junto a las pertenecientes al género *Bacillus* para la obtención de proteasas alcalinas (Ningthoujam *et al.*, 2009). Sin embargo, y en comparación con estas últimas, las proteasas generadas por actinobacterias, al igual que otros muchos tipos de enzimas, han recibido poca atención (Mehta *et al.*, 2006; Lü *et al.*, 2014), ya que este grupo microbiano siempre ha atraído el interés de la industria por su capacidad para producir antibióticos. No obstante, la siempre creciente demanda de enzimas proteolíticas, especialmente si exhiben propiedades diferenciadoras, ha dirigido la atención de los investigadores y la industria hacia el grupo de las bacterias filamentosas, cuya capacidad hidrolítica es ampliamente reconocida (Sonia *et al.*, 2011).

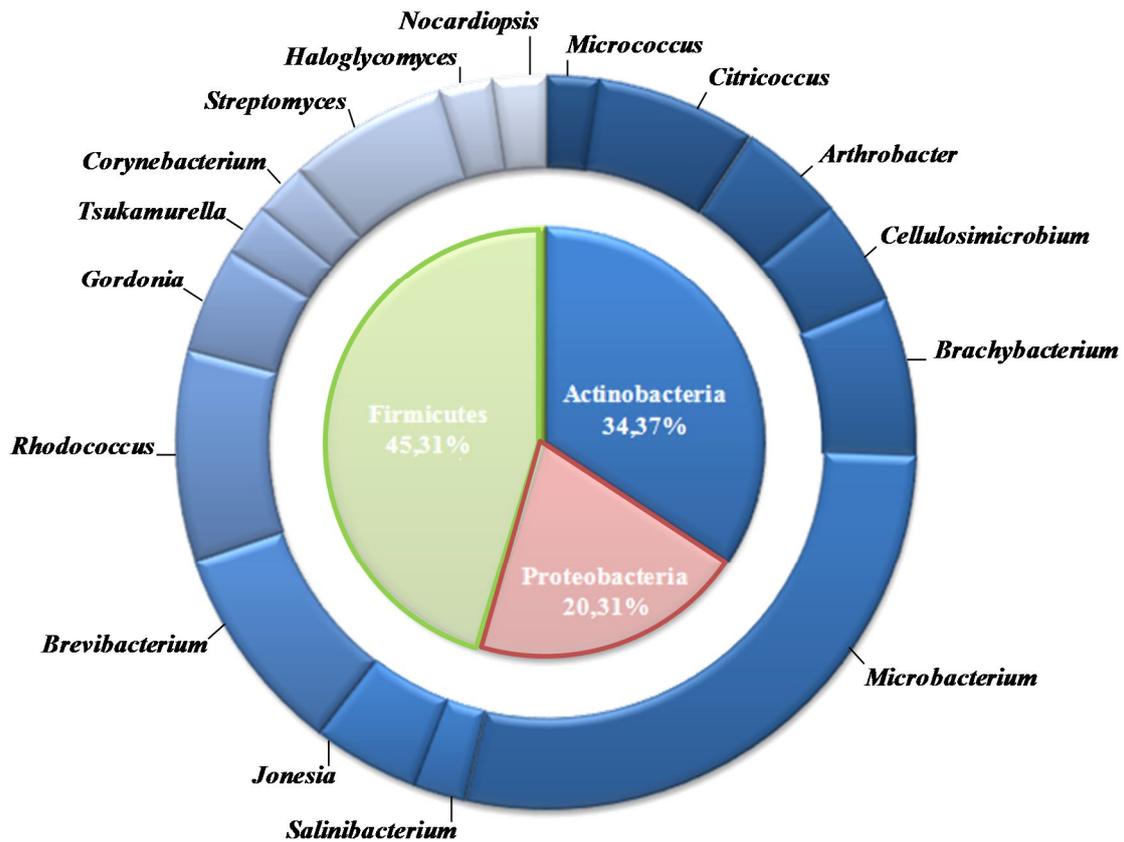


Figura 4. Distribución por géneros de la comunidad proteolítica perteneciente al Filo Actinobacteria.

Los géneros dominantes entre la comunidad proteolítica de actinobacterias descrita en el presente trabajo ya han sido anteriormente referenciados como productores de enzimas capaces de hidrolizar proteínas, Así, *Brevibacterium linens* contribuye de forma activa al proceso de maduración del queso gracias, entre otras capacidades, a la producción de proteasas (Onraedt *et al.*, 2005), funcionalidad similar a la descrita para *Microbacterium* spp., cuya presencia en quesos maduros es habitual (McSweeney., 2007), mientras que especies de *Rhodococcus* han sido identificadas como productoras de subtilisina, una proteasa empleada como ingrediente en detergentes (Niehaus *et al.*, 2011).

compostados, lo que propicia la existencia de importantes variaciones entre procesos en lo que respecta a la microbiota y les confiere singularidad (López González *et al.*, 2015).

En oposición a la abundancia de especies representantes de los diversos géneros de actinobacterias detectados, los aislados identificados como *Microbacterium* no se encontraron entre los que generaron la máxima actividad proteolítica (Figura 6.), al igual que los asignados al género *Rhodococcus*. En el caso de *Brevibacterium*, por el contrario, sí se encontró uno de sus representantes ubicado entre los de mayores niveles de hidrólisis proteica, *B. aureum*, junto a *Corynebacterium stationis*, *Salinibacterium xinjiangense*, *Cellulosimicrobium cellulans* y *Nocardiopsis alba*. Algunas de estas especies ya son reconocidas productoras de enzimas proteolíticas, como sucede con *C. cellulans* (Ferracini Santos y Sato, 2009) o *N. alba* (Bennur *et al.*, 2014), mientras que otras no han sido relacionadas de forma importante con este tipo de actividad. Así, *B. aureum* es referenciada por la producción de biosurfactantes (Kiran *et al.*, 2011), mientras que *C. stationis*, a pesar de estar asociada a entornos en los que la concentración proteica es alta, tales como leche y derivados lácteos (Masoud *et al.*, 2011), no ha sido destacada por su actividad proteolítica. En el caso de *Salinibacterium xinjiangense*, la información disponible es realmente escasa, aunque en las primeras descripciones hechas de la especie se destaca la ausencia de actividades relacionadas con la hidrólisis de compuestos de naturaleza proteica, tales como gelatina y caseína (Zhang *et al.*, 2008).

La actividad específica, aunque no se correspondió de forma estricta con la actividad enzimática, sí repitió de forma general los resultados de esta. Las excepciones se detectaron para *Brevibacterium epidermidis*, *Citricoccus zhacaiensis* y *Streptomyces lividans*, cuyos niveles destacaron de forma significativa, especialmente considerando que estas dos últimas no se encontraron entre las especies de mayor actividad. Los análisis estadísticos (Tablas 5a-5d, Anexo) confirman la significancia de estas diferenciaciones.

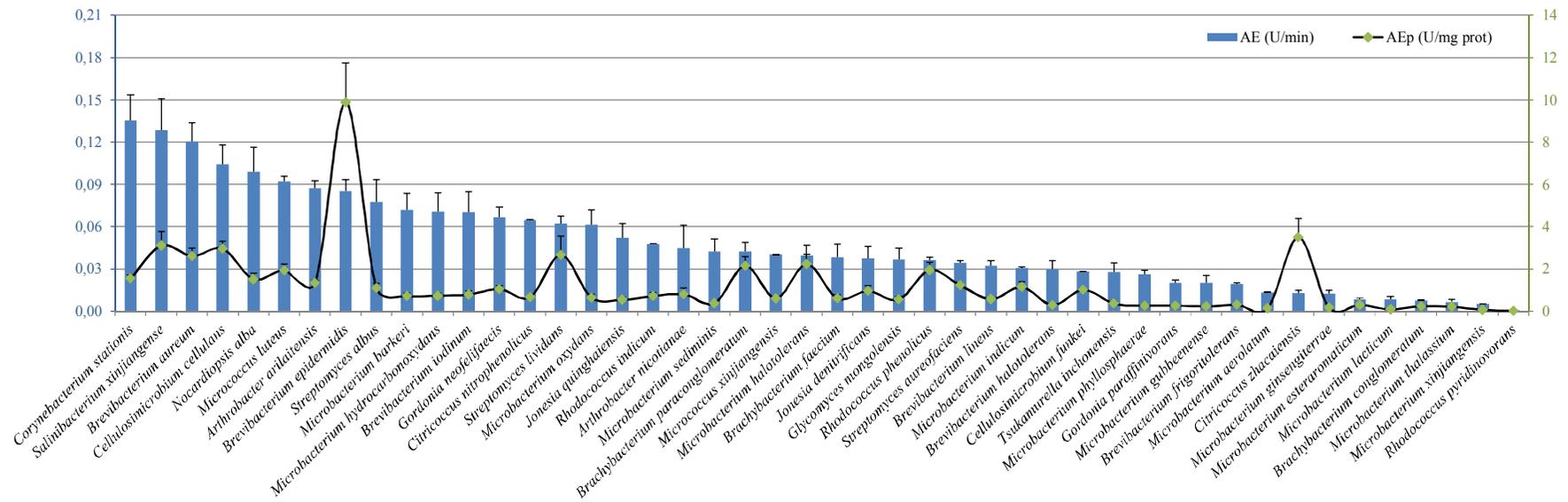


Figura 6. Cuantificación de la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica en especies pertenecientes al Filo Actinobacteria.

4.3. COMUNIDAD PROTEOLÍTICA: FILO FIRMICUTES

El Filo Firmicutes fue dominante entre la comunidad proteolítica asociada al proceso de compostaje de residuos hortícolas. Hasta 49 de los aislados de la colección quedaron encuadrados en este grupo taxonómico, con absoluto protagonismo de las especies pertenecientes al género *Bacillus* y otros relacionados (Figura 7). Sólo 7 de los microorganismos asignados a este Filo fueron identificadas como pertenecientes a géneros distintos. En concreto, *Chryseomicrobium*, *Lactococcus* y *Staphylococcus*.

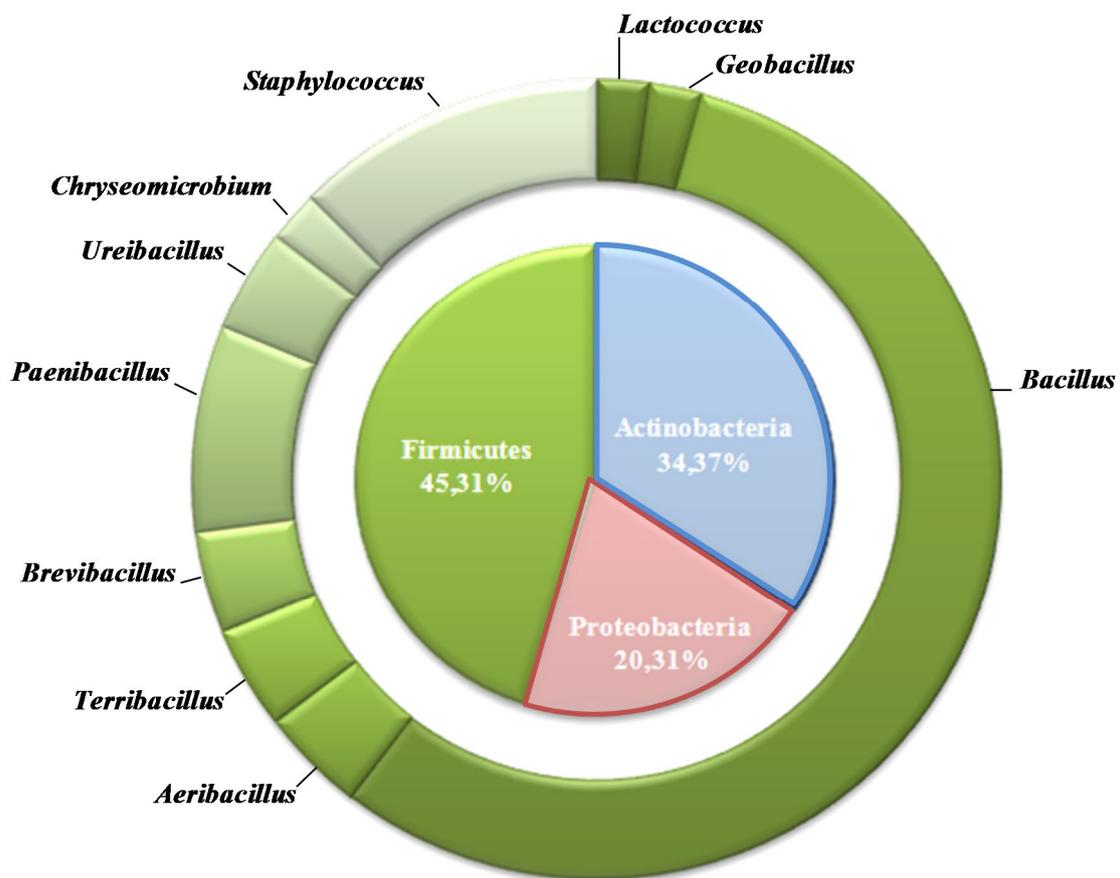


Figura 7. Distribución por géneros de la comunidad proteolítica perteneciente al Filo Firmicutes.

El dominio ejercido por los géneros *Bacillus* y relacionados entre las especies proteolíticas asociadas al proceso de compostaje no ha de resultar extraño. Por un lado, este grupo de microorganismos es reconocido como uno de los más importantes en la

transformación aeróbica de residuos orgánicos en función del papel que desempeñan (Maeda *et al.*, 2010; López González *et al.*, 2015) y, por otro, las especies de *Bacillus* aparecen, sin duda, entre las más destacadas en lo que respecta a la producción industrial de proteasas (Genckal y Tari, 2006). Con respecto a los representantes de otros géneros, destacan por su número los pertenecientes al género *Staphylococcus*, el cual, a pesar de no ser relevante a escala industrial, sí que es reconocido como productor de proteasas, especialmente metaloproteasas, de interés en el sector farmacéutico (Ducros *et al.*, 2009).

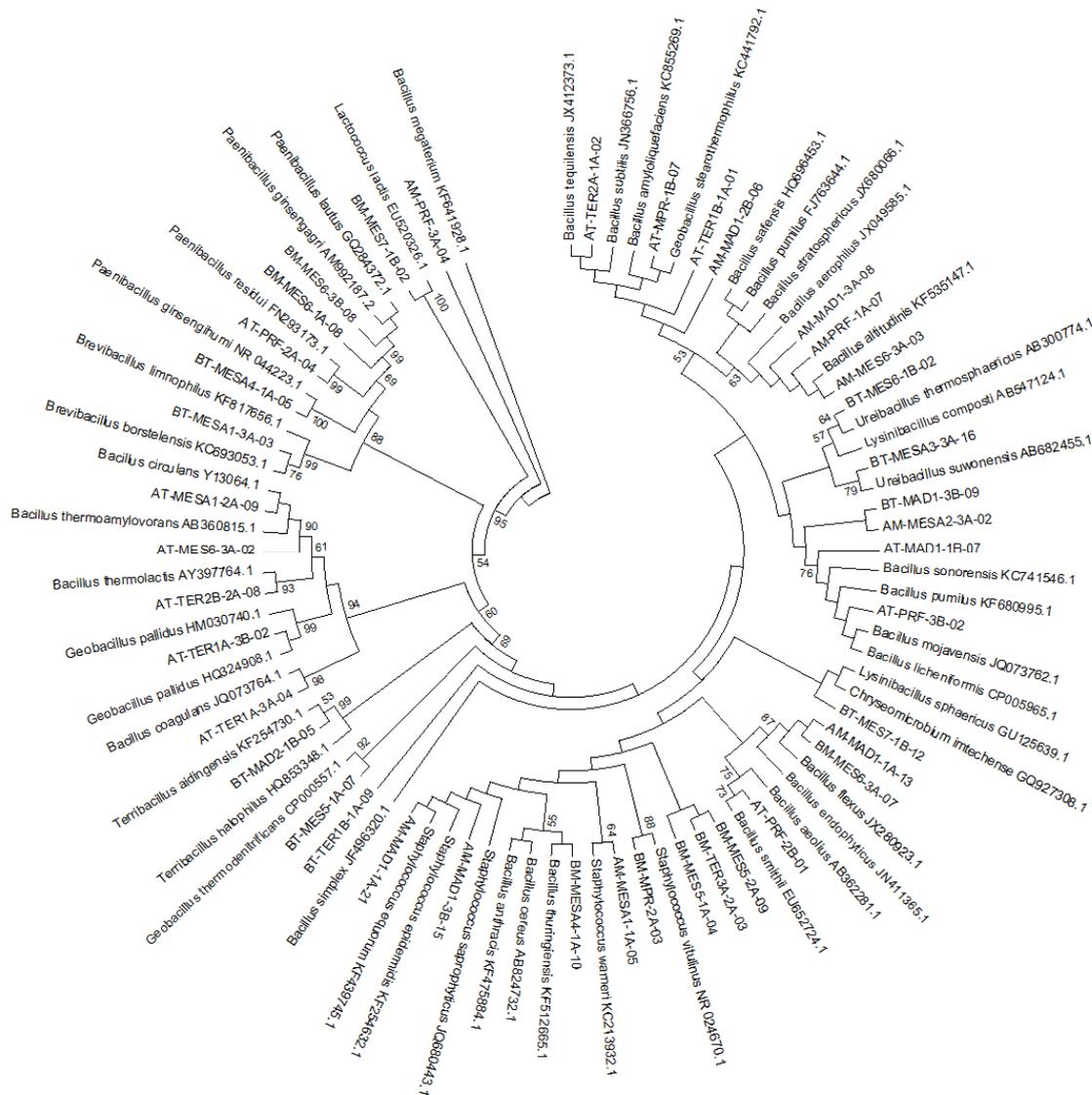


Figura 8. Relaciones evolutivas de los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Firmicutes.

A pesar de la anteriormente comentada importancia de *Bacillus*, sólo una especie perteneciente a este género se situó entre las siete más destacadas por su nivel de actividad proteolítica (Figura 9). Dicha especie fue *B. thermoamylovorans* que, a pesar de ser miembro habitual de la microbiota asociada a entornos ricos en proteínas, tales como la leche (Lücking *et al.*, 2013), no ha sido especialmente reconocida por su capacidad proteolítica. Junto a *Geobacillus stearothermophilus*, integró la pareja de aislados pertenecientes al Filo Firmicutes cuyo nivel de actividad proteolítica fue significativamente superior al resto (Tabla 6c, Anexo), aunque en términos de actividad específica esta última fue significativamente inferior, siendo *Paenibacillus ginsengihumi* la única especie que pudo igualar los valores generados por *B. thermoamylovorans* (Tabla 6d, Anexo). Resulta interesante el comportamiento de los representantes del género *Staphylococcus*, cuyos niveles de actividad específica los situaron en posiciones más destacadas que los correspondientes a la actividad enzimática absoluta. La actividad proteolítica de este grupo bacteriano resulta de especial interés en el sector alimentario, en el que se utilizan como inoculantes externos o actúan como microbiota autóctona en el procesado de derivados cárnicos (Casaburi *et al.*, 2008).

La alta actividad proteolítica mostrada por *Geobacillus stearothermophilus* y otras especies del género resulta de gran interés, ya que las proteasas asociadas a ellas suelen mostrar propiedades diferenciadoras, tales como termoestabilidad o resistencia a desnaturalizantes químicos, que las hacen especialmente atractivas en aplicaciones biotecnológicas (Zhu *et al.*, 2007). Algo similar sucede con las proteasas descritas en especies de *Paenibacillus*, ya que poseen características que las hacen compatibles en formulaciones de detergentes (Rai *et al.*, 2010), o las de *Lysinibacillus*, con capacidad de actuación en un amplio rango de condiciones (Prabha *et al.*, 2014).

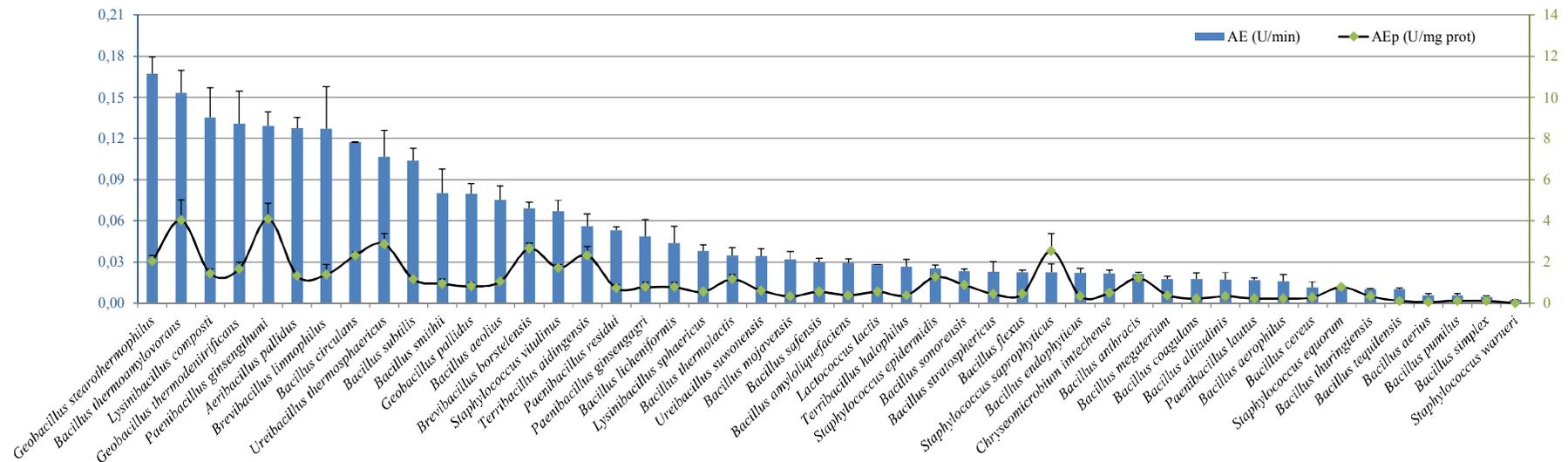


Figura 9. Cuantificación de la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica en especies pertenecientes al Filo Firmicutes.

4.4. COMUNIDAD PROTEOLÍTICA: FILO PROTEOBACTERIA

La comunidad de bacterias proteolíticas pertenecientes al Filo Proteobacteria fue el menos numeroso, con un total de 25 representantes, entre las que destacaron por su dominancia numérica las especies del género *Pseudomonas* (Figura 10). Los aislados pertenecientes a este género son habituales en compostaje y, junto a *Bacillus*, suelen dominar la microbiota procarionta asociada a este tipo de procesos (Schloss *et al.*, 2005). Por otra parte, exhiben un elevado y diverso potencial enzimático, siendo destacable en lo que a proteasas se refiere, su capacidad para la síntesis de metaloproteasas (Sumantha *et al.*, 2006). Otros géneros detectados con relativa frecuencia, tales como *Brevundimonas* o *Acinetobacter* son también habitantes habituales de hábitats con elevado contenido proteico y muestran capacidad para hidrolizar proteínas (Baur *et al.*, 2015).

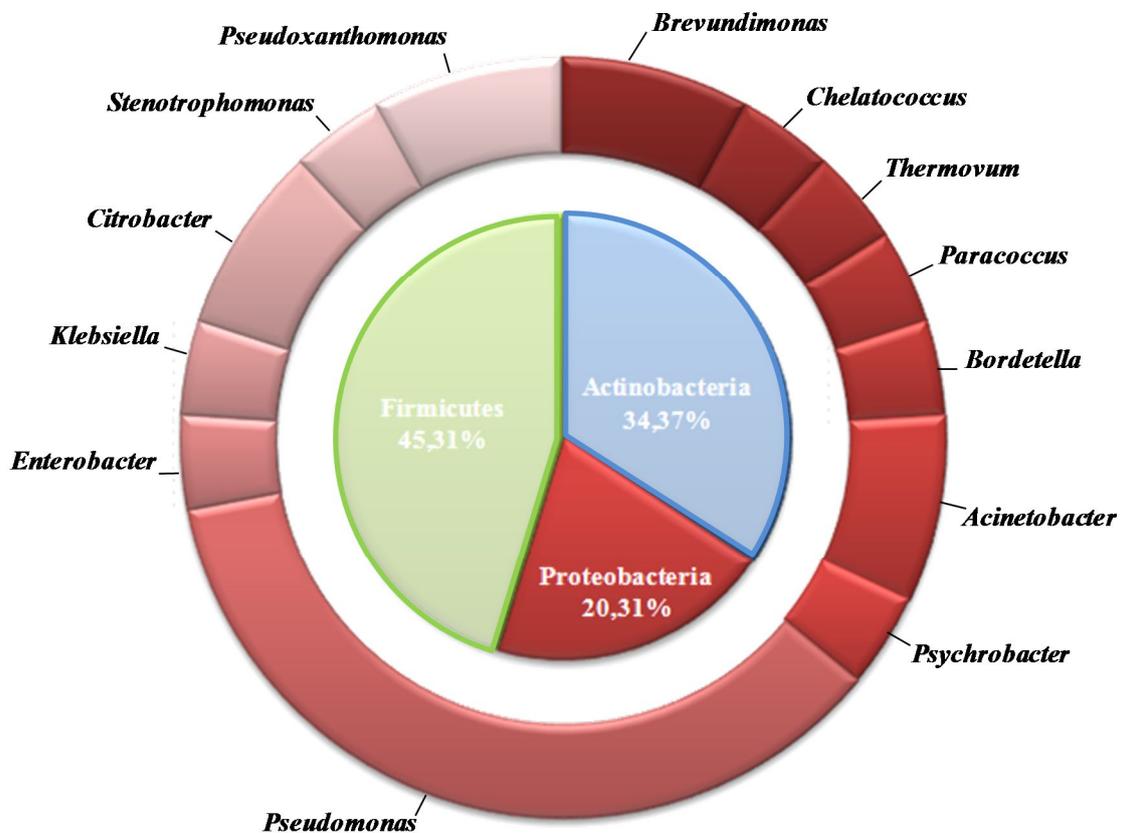


Figura 10. Distribución por géneros de la comunidad proteolítica perteneciente al Filo Proteobacteria.



Figura 11. Relaciones evolutivas de los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Proteobacteria.

Tres especies destacaron significativamente sobre el resto en lo referente a actividad enzimática (Figura 12; Tabla 7c, Anexo): *Thermovum composti*, *Pseudomonas xanthomarina* y *Psychrobacter celer*. Además, y al contrario de lo sucedido en Actinobacteria y Firmicutes, también estos aislados, junto a *Pseudomonas plecoglossicida*, fueron los que dieron lugar a la máxima actividad específica. Las referencias sobre estas la capacidad proteolítica de estas especies es realmente escasa (Yu *et al.*, 2009; Irlinger *et al.*, 2012) y, en el caso de *T. composti*, inexistentes. Este aspecto resulta de especial interés, ya que pone de manifiesto la idoneidad del proceso

de compostaje como fuente de nuevas especies con capacidad para producir enzimas proteolíticas.

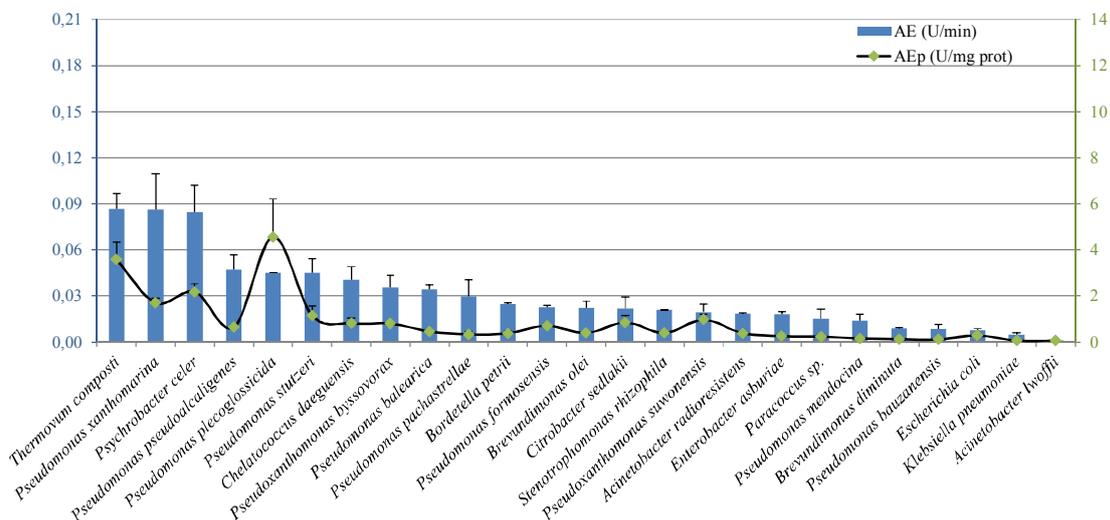


Figura 12. Cuantificación de la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica en especies pertenecientes al Filo Proteobacteria.

4.5. COMUNIDAD PROTEOLÍTICA: ESPECIES NO IDENTIFICADAS

Un total de 49 aislados de la colección proteolítica derivada del proceso de compostaje de residuos hortícolas no pudieron ser identificados. Como ya se comentó previamente, tal hecho pueda ser debido a la dificultad que muestran ciertos grupos procariontas para generar secuencias del gen 16S mediante PCR con la suficiente calidad (Woo *et al.*, 2008). Entre ellas se encontraron algunas especies con valores de actividad enzimática importantes en el conjunto de la colección, detectándose hasta nueve cepas con niveles superiores a $0,09 \text{ U min}^{-1}$ (Figura 13). Cuatro de ellas, además, también se situaron entre las que generaron los mayores niveles de actividad específica (Tabla 8d, Anexo). Esta coincidencia incide sobre la importancia de la actividad proteolítica entre las cepas que responden a este perfil, ya que apunta a un mayor peso relativo de este tipo de enzimas en el conjunto de capacidades bioquímicas exhibidas por los microorganismos afectados.

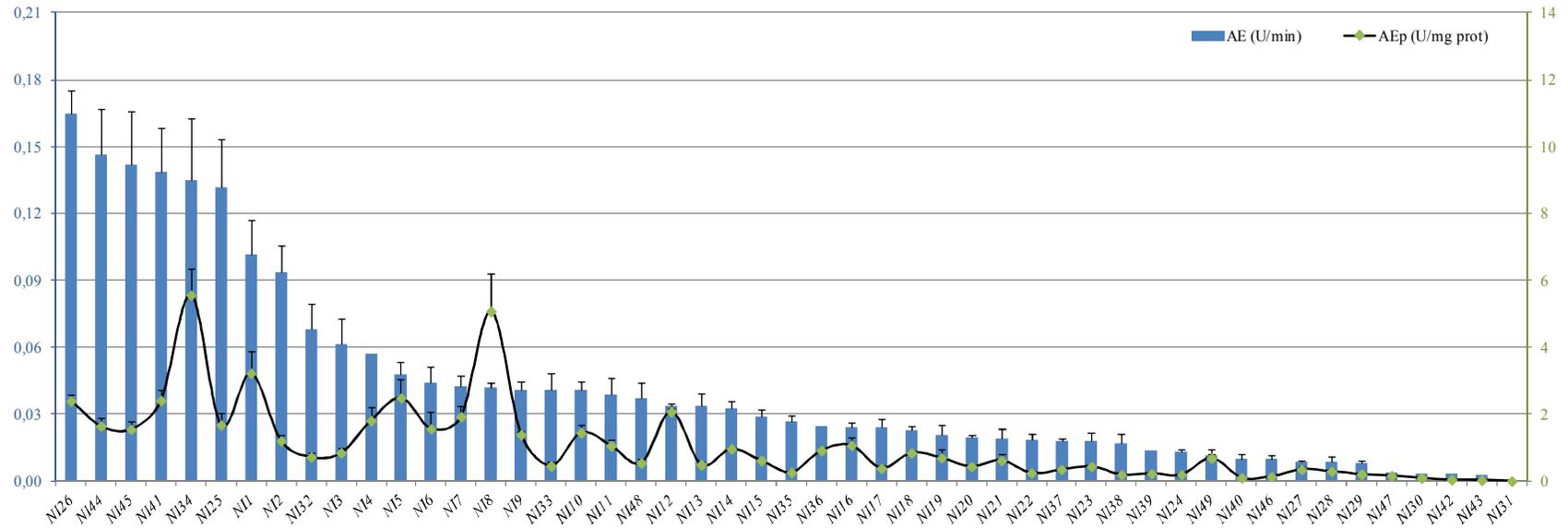


Figura 13. Cuantificación de la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica en especies No Identificadas.

4.6. SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN

El análisis conjunto de los resultados generados por la colección mostró la homogeneidad en el perfil proteolítico de los distintos grupos establecidos. Sólo la actividad enzimática mostrada por el Filo Proteobacteria se diferenció significativamente del resto de grupos, ya que los niveles exhibidos por el conjunto de especies integradas en este grupo quedó por debajo de los valores mostrados por el resto (Tabla 4). En el caso de la actividad específica, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para las variables Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica en función del factor Filo para los aislados de la colección proteolítica.

Actividad Enzimática		Actividad Enzimática Específica	
Filo	Grupos de Homogeneidad	Filo	Grupos de Homogeneidad
Proteobacteria		Proteobacteria	
No Identificados		Firmicutes	
Firmicutes		No Identificados	
Actinobacteria		Actinobacteria	

Tras el estudio cuantitativo realizado a partir de la colección proteolítica obtenida, se procedió a efectuar la selección de los cinco aislados más eficaces en cuanto a su capacidad proteolítica. Los resultados obtenidos, tras ser estadísticamente analizados de forma global, llevaron a la selección de tres especies pertenecientes al Filo Firmicutes y dos aislados no identificados: *Geobacillus stearothermophilus* (AE=0,17 U min⁻¹), *Bacillus thermoamylovorans* (AE=0,15 U min⁻¹), NI26 (AE=0,15 U min⁻¹), *Lysinibacillus composti* (AE=0,14 U min⁻¹) y NI44 (AE=0,14 U min⁻¹). Todas ellas fueron sometidas a un proceso de concentración.

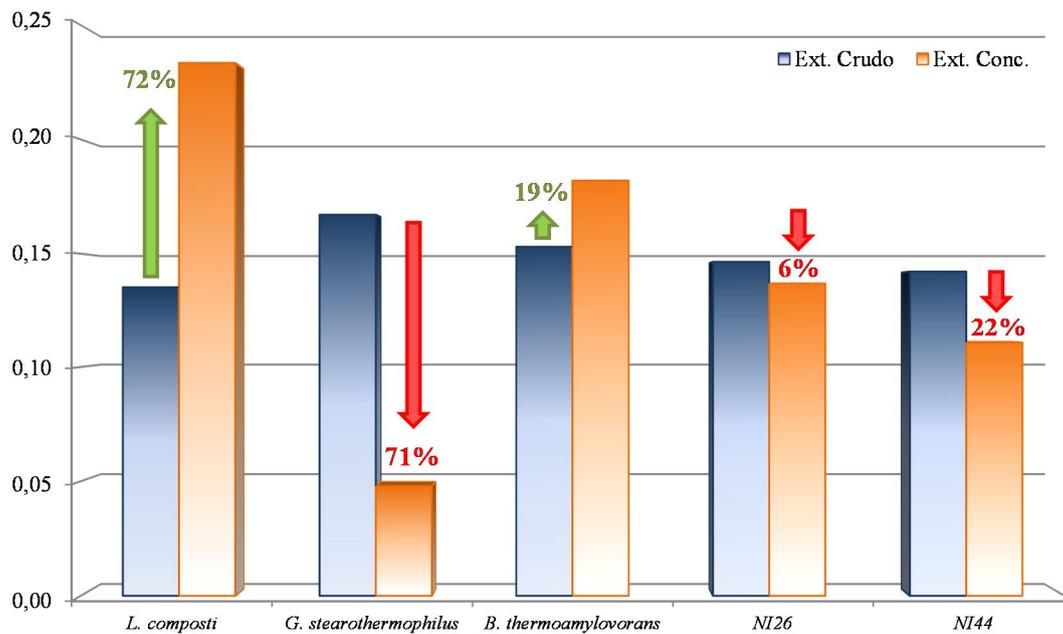


Figura 14. Comparativa entre los niveles de Actividad Enzimática pre y post-concentración.

Sólo dos de los aislados, *L. composti* y *B. thermoamylovorans*, dieron lugar a niveles de actividad superiores tras la aplicación del protocolo de concentración. Este resultado que, en principio puede resultar sorprendente, no lo es tanto si se considera que gran parte de las proteasas demandan la presencia de cofactores para poder ejercer su funcionalidad, especialmente en el caso de las metaloproteasas (Kumar *et al.*, 2008). El protocolo de concentración aplicado utiliza membranas con tamaño de poro tal que propicia el descenso e incluso la pérdida completa de los iones que este tipo de proteasas demanda.

5. CONCLUSIONES

Las proteasas microbianas acaparan gran parte del mercado global de enzimas. Su nivel de demanda propicia la existencia de programas de búsqueda y selección que permitan la obtención de nuevas especies productoras o enzimas con propiedades diferenciadoras,

adaptadas a marcos específicos de actuación. El presente Trabajo Fin de Máster se encuadra en dicho escenario y se postula como un estudio preliminar en este sentido. No obstante y, a pesar de dicho carácter preliminar, el estudio realizado permite obtener las siguientes conclusiones:

1. Las pilas de compostaje, por sus características ambientales y nutricionales, se constituyen como un hábitat idóneo para la búsqueda y selección de especies proteolíticas.
2. Aunque el espectro de especies proteolíticas asociado al proceso de compostaje de residuos hortícolas es diverso, las pertenecientes al Filo Firmicutes abundan en mayor proporción.
3. De forma global, las diferencias en la actividad proteolítica entre los distintos grupos microbianos no son especialmente significativas. No obstante, y desde una perspectiva de especie, los aislados con mayores niveles pertenecen al Filo Firmicutes y, de forma concreta, al género *Bacillus* y asociados.
4. La amplia diversidad microbiana típica del proceso de compostaje permite aislar especies proteolíticas de nuevo cuño, tales como las actinobacterias pertenecientes a los géneros *Haloglycomices*, *Jonesia*, *Salinibacterium* y *Tsukamurella* o las proteobacterias *Thermovum composti*, *Pseudomonas xanthomarina* y *Psychrobacter celer*.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo Fin de Máster ha sido financiado a través del proyecto CICyT AGL2012-36434.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9, 71-74.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological methods* 55, 541-555.
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., Fischer, L. 2015. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 49, 23-29.
- Bennur, T., Kumar, A.R., Zinjarde, S., Javdekar, V. 2014. Nocardiosis species as potential sources of diverse and novel extracellular enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 9173-9185.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., Villani, F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology* 25, 335-347.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Jodha, D., Singh, J. 2011. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: An overview. *Reviews in Medical Microbiology* 22, 96-101.
- Chu, W.H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 241-245.
- Craik, C., Page, M., Madison, E. 2011. Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal* 435, 1-17.
- Ducros, E., Ferrari, M., Pellegrino, M., Raspanti, C., Bogni, C. 2009. Effect of aeration and agitation on the protease production by *Staphylococcus aureus* mutant RC128 in a stirred tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32, 143-148.
- Ferracini Santos, L., Sato, H.H. 2009. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 54-60.
- Genckal, H., Tari, C. 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 703-710.
- Geok, L.P., Razak, C.N.A., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M., Salleh, A.B. 2003. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal* 13, 73-77.
- Irlinger, F., Yuen in Yung, A.S., Sarthou, A.S., Delbès-Pau, C., Montel, M.C., Coton, E., Coton, M., Helinck, S. 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153, 332-338.
- Kim, E.H., Cho, K.H., Lee, Y.M., Yim, J.H., Lee, H.K., Cho, J.C., Hong, S.G. 2010. Diversity of cold-active protease-producing bacteria from arctic terrestrial and marine environments revealed by enrichment culture. *The Journal of Microbiology* 48, 426-432.
- Kiran, G., Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S. 2011. Biosurfactants and green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles. *Critical Reviews in Biotechnology* 31, 354-364.
- Kumar, D., Savitri, N., Thakur, R., Verma, T., Bhalla, C. 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology* 3, 661-672.
- Loperena, L., Soria, V., Varela, H., Lupo, S., Bergalli, A., Guigou, M., Pellegrino, A., Bernardo, A., Calviño, A., Rivas, F., Batista, S. 2012. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2249-2256.
- López González, J.A., Suárez Estrella, F., Vargas García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M., Casco, J. 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its

- structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406-416.
- Lü, J., Wu, X., Jiang, Y., cai, X., Huang, L., Yang, Y., Wang, H., Zeng, A., Li, A. 2014. An extremophile *Microbacterium* strain and its protease production under alkaline conditions. *Journal of Basic Microbiology* 54, 378-385.
- Lücking, G., Stoecker, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., Ehling-Schulz, M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 166, 270-279.
- Maeda, K., Hanajima, D., Morioka, R., Osada, T. 2010. Characterization and spatial distribution of bacterial communities within passively aerated cattle manure composting piles. *Bioresource Technology* 101, 9631-9637.
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Al-Soud, W.A., Sørensen, S., Jakobsen, M. 2011. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International dairy Journal* 21, 142-148.
- McSweeney, P.L.H. 2007. Cheese manufacture and ripening and their influence on cheese flavour. En: Weimer, B.C. (Ed.). *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, pp. 1-25.
- Mehta, V.J., Thumar, J.T., Singh, S.P. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology* 97, 1650-1654.
- Mignard, S., Fandroy, J.O. 2006. 16s rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of microbiological Methods* 67, 574-581.
- Niehaus, F., Gabor, E., Wieland, S., Siegert, P., Maurer, K.H., Eck, J. 2011. Enzymes for the laundry industries: Tapping the vast metagenomics pool of alkaline proteases. *Microbial Biotechnology* 4, 767-776.
- Ningthoujam, D.S., Kshetri, P., Sanasam, S., Nimaichand, S. 2009. Screening, identification, of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetea. *World Applied Sciences Journal* 7, 907-916.
- Ohnishi, A., Nagano, A., Fujimoto, N., Suxuki, M. 2011. Phylogenetic and physiological characterization of mesophilic and thermophilic bacteria from a sewage sludge composting process in Saporu, Japan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 333-340.
- Olayuyigbe, F.M., Alele, J.O. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology* 4, 776-779.
- Onraedt, A., Soetaert, W., Vandamme, E. 2005. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. *Biotechnology Letters* 27, 527-533.
- Prabha, M.S., Divakar, K., Priya, J.D.A., Selvam, G.P., Balasubramanian, N., Gautam, P. 2014. Statistical analysis of production of protease and esterase by a newly isolated *Lysinibacillus fusiformis* AU01: purification and application of protease in sub-culturing cell lines. *Annals of Microbiology* 65, 33-46.
- Rai, S.K., Roy, J.K., Mukherjee, A.K. 2010. Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. nov. AS-S24-II. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1437-1450.
- Saha, S., Dhanasekaran, D. 2010. Isoaltion and screening of keratinolytic actinobacteria from keratin waste dumped soil in Tiruchirappalli and Nammakkal, Tamil Nadu, India. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2, 124-131.
- Sawant, R., Nagendran, S. 2014. Protease: An enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3, 568-579.
- Saxena, S. 2015. Microbial enzymes and their industrial applications. En: Saxena, S. (Ed.) *Applied Microbiology*. Springer, Nueva Delhi, pp. 121-154.
- Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Gossett, J.G., Walker, L.P. 2005. Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 457-463.
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Mandal, A.B. 2012. Application of enzymes for dehairing of skins: Cleaner leather processing. *Clean technologies and Environmental Policy* 14, 889-897.
- Sonia, M.T., Hafedh, B., Abdennaceur, H., Ali, G. 2011. Studies on the ecology of actinomycetes in an agricultural soil

- amenden with organic residues: II. Assessment of enzymatic activities of Actinomycetales isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2251-2259.
- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I. 2007a. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology* 158 617-624.
- Steger, K., Sjögren, Å.M., Jarvis, Å., Jansson, J.K., Sundh, I. 2007b. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology* 103, 487-498.
- Subba Rao, C., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S. 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry* 44, 262-268.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A., 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44, 211-220.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tavano, O.L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90, 1-11.
- Theron, L.W., Divol, B. 2014. Microbial aspartic proteases: Current and potential application in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 8853-8868.
- Vaz-Moreira, I., Silva, M.E., Manaia, C.M., Nunes, O.C. 2008. Diversity of bacterial isolates from commercial and homemade composts. *Microbial Ecology* 55, 714-722.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. 2007. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261-5267.
- Wang, C., Guo, X., Deng, H., Dong, D., Tu, Q., Wu, W. 2014. New insights into the structure and dynamics of actinomycetal community during manure composting. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 3327-3337.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.P.K., Teng, J.L.L., Tse, H., Yuen, K.Y. 2008. Then and now: Use of 16s rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 908-934.
- Wu, J.W., Chen, X.L. 2011. Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 253-262.
- Yu, Y., Li, H., Zeng, Y., Chen, B. 2009. Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. *Polar Biology* 32, 1539-1547.
- Zhang, D.C., Liu, H.C., Xin, Y.H., Yu, Y., Zhou, P.J., Zhou, Y.G. 2008. *Salinibacterium xinjiangense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2739-2742.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q., Shen, P. 2007. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1592-1597.

7. ANEXOS

A continuación se incluyen los análisis estadísticos realizados a partir de los datos obtenidos. En todos los casos se aportan Análisis de Varianza y Test de Rangos Múltiples para las variables Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica.

Tabla 5a. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Actinobacteria.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	4578,35	44	104,053	46,80	0,0000
B:Repetición	2,45792	2	1,22896	0,55	0,5773
RESIDUOS	202,338	91	2,2235		
TOTAL (CORREGIDO)	4783,15	137			

Tabla 5b. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática Específica en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Actinobacteria.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	10,8162	44	0,245823	51,80	0,0000
B:Repetición	0,00693188	2	0,00346594	0,73	0,4846
RESIDUOS	0,431885	91	0,00474599		
TOTAL (CORREGIDO)	11,255	137			

Tabla 5c. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Actinobacteria.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Rhodococcus pyridinovorans</i>	
<i>Microbacterium xinjiangensis</i>	
<i>Microbacterium thalassium</i>	
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	
<i>Microbacterium lacticum</i>	
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	
<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>	
<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	
<i>Microbacterium aerolatum</i>	
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	
<i>Tsukamurella inchonensis</i>	
<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	
<i>Microbacterium indicum</i>	
<i>Brevibacterium linens</i>	

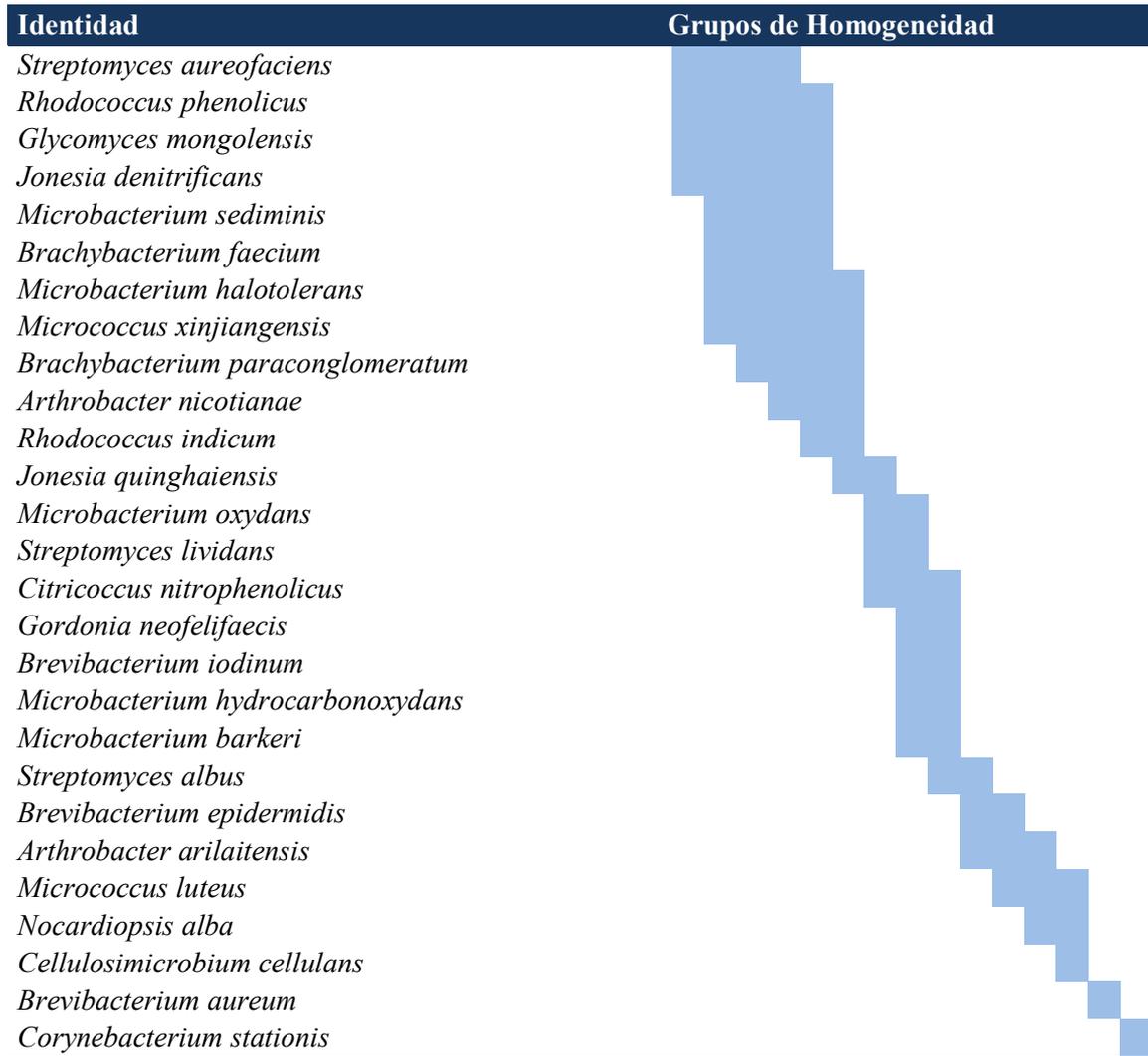
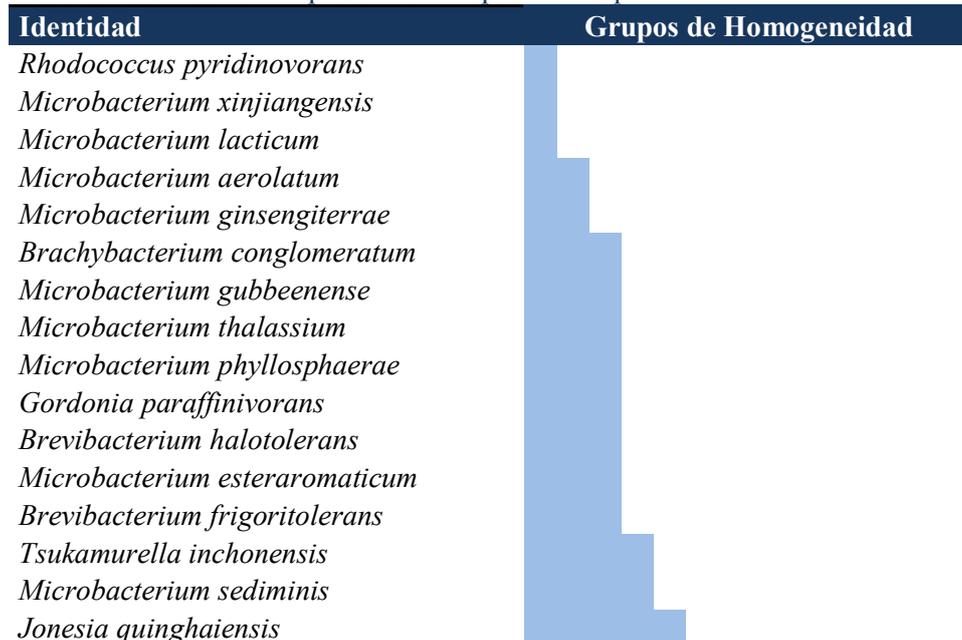


Tabla 5d. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática Específica en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Actinobacteria.



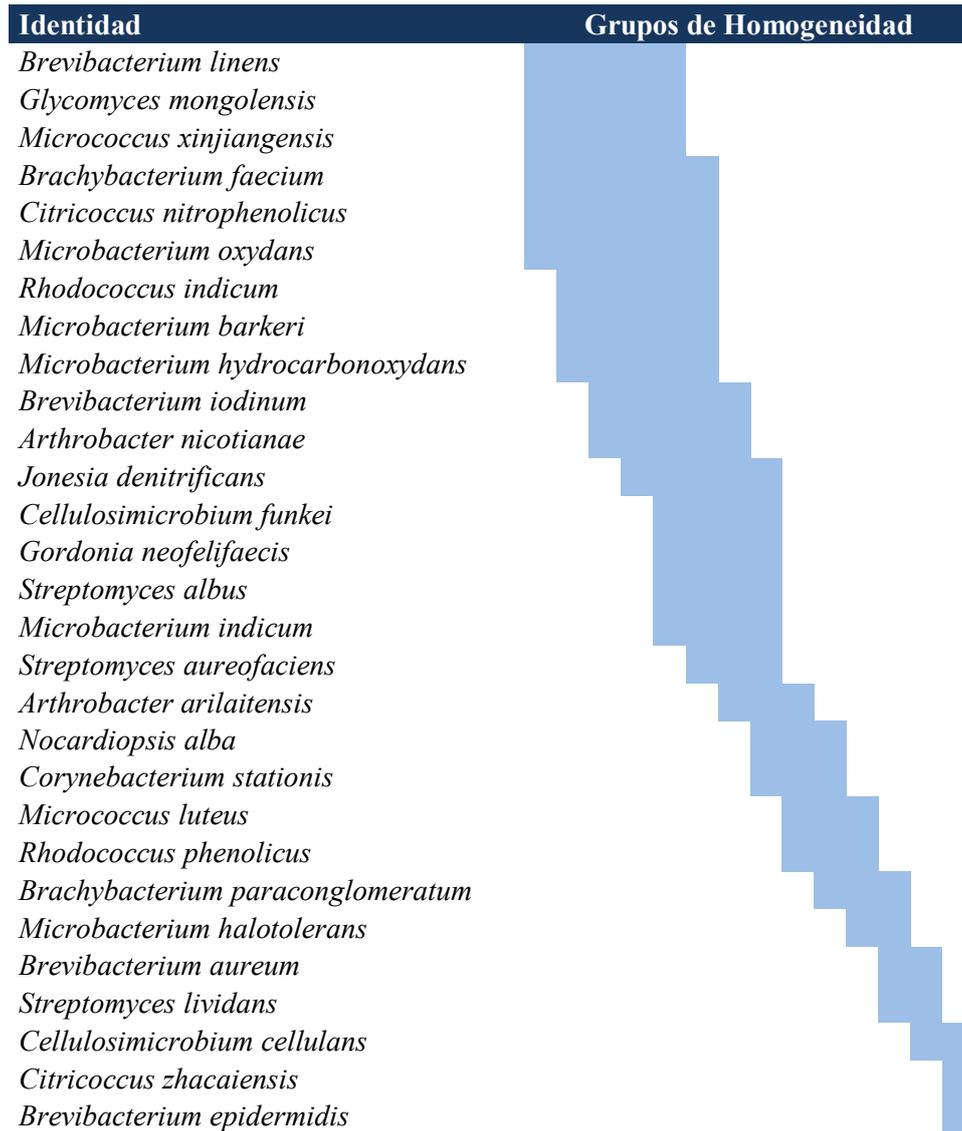


Tabla 6a. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Firmicutes.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	9784,66	47	208,184	54,86	0,0000
B:Repetición	0,0177102	2	0,0088551	0,00	0,9977
RESIDUOS	368,104	97	3,79489		
TOTAL (CORREGIDO)	10152,8	146			

Tabla 6b. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática Específica en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Firmicutes.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	4,45399	47	0,0947656	38,83	0,0000
B:Repetición	0,0160871	2	0,00804354	3,30	0,0412
RESIDUOS	0,236713	97	0,00244034		
TOTAL (CORREGIDO)	4,70679	146			

Tabla 6c. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Firmicutes.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Bacillus simplex</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Bacillus aerius</i>	1
<i>Bacillus tequilensis</i>	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1
<i>Staphylococcus equorum</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus aerophilus</i>	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Bacillus altitudinis</i>	1
<i>Bacillus coagulans</i>	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus anthracis</i>	1
<i>Chryseomicrobium imtechense</i>	1
<i>Bacillus endophyticus</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus stratosphericus</i>	1
<i>Bacillus sonorensis</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Terribacillus halophilus</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus safensis</i>	1
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1
<i>Bacillus mojavensis</i>	1
<i>Ureibacillus suwonensis</i>	1
<i>Bacillus thermolactis</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Paenibacillus ginsengagri</i>	1
<i>Paenibacillus residui</i>	1
<i>Terribacillus aitingensis</i>	1
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	1
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1
<i>Bacillus aeolius</i>	1
<i>Geobacillus pallidus</i>	1
<i>Bacillus smithii</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	1
<i>Bacillus circulans</i>	1
<i>Brevibacillus limnophilus</i>	1
<i>Aeribacillus pallidus</i>	1
<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	1
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	1

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Lysinibacillus composti</i>	1
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	3

Tabla 6d. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática Específica en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Firmicutes.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Bacillus aerius</i>	2
<i>Bacillus pumilus</i>	3
<i>Bacillus tequilensis</i>	4
<i>Bacillus simplex</i>	5
<i>Bacillus aerophilus</i>	6
<i>Bacillus coagulans</i>	7
<i>Paenibacillus lautus</i>	8
<i>Bacillus cereus</i>	9
<i>Bacillus altitudinis</i>	10
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11
<i>Bacillus mojavensis</i>	12
<i>Bacillus endophyticus</i>	13
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14
<i>Bacillus megaterium</i>	15
<i>Terribacillus halophilus</i>	16
<i>Bacillus flexus</i>	17
<i>Bacillus stratosphericus</i>	18
<i>Chryseomicrobium intechense</i>	19
<i>Bacillus safensis</i>	20
<i>Lactococcus lactis</i>	21
<i>Ureibacillus suwonensis</i>	22
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	23
<i>Paenibacillus residui</i>	24
<i>Bacillus licheniformis</i>	25
<i>Staphylococcus equorum</i>	26
<i>Paenibacillus ginsengagri</i>	27
<i>Geobacillus pallidus</i>	28
<i>Bacillus sonorensis</i>	29
<i>Bacillus smithii</i>	30
<i>Bacillus aeolius</i>	31
<i>Bacillus thermolactis</i>	32
<i>Bacillus subtilis</i>	33
<i>Bacillus anthracis</i>	34
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35
<i>Aeribacillus pallidus</i>	36
<i>Brevibacillus limnophilus</i>	37
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	38
<i>Lysinibacillus composti</i>	39
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	40

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	
<i>Terribacillus aidingensis</i>	
<i>Bacillus circulans</i>	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	
<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	

Tabla 7a. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Proteobacteria.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	1705,16	24	71,0484	27,55	0,0000
B:Repetición	1,35175	2	0,675877	0,26	0,7705
RESIDUOS	131,505	51	2,57852		
TOTAL (CORREGIDO)	1838,02	77			

Tabla 7b. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática Específica en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Proteobacteria.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	2,93051	24	0,122105	25,48	0,0000
B:Repetición	0,0116949	2	0,00584744	1,22	0,3036
RESIDUOS	0,244372	51	0,0047916		
TOTAL (CORREGIDO)	3,18658	77			

Tabla 7c. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Proteobacteria.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Paracoccus sp.</i>	
<i>Enterobacter asburiae</i>	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>	
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	
<i>Citrobacter sedlakii</i>	
<i>Brevundimonas olei</i>	
<i>Pseudomonas formosensis</i>	
<i>Bordetella petrii</i>	
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	
<i>Pseudomonas balearica</i>	
<i>Pseudoxanthomonas byssovorax</i>	
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
<i>Psychrobacter celer</i>	
<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	
<i>Thermovum composti</i>	

Tabla 7d. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática Específica en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos pertenecientes al Filo Proteobacteria.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	
<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Paracoccus</i> sp.	
<i>Enterobacter asburiae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	
<i>Brevundimonas olei</i>	
<i>Bordetella petrii</i>	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	
<i>Pseudomonas balearica</i>	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
<i>Pseudomonas formosensis</i>	
<i>Pseudoxanthomonas byssovorax</i>	
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	
<i>Citrobacter sedlakii</i>	
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	
<i>Psychrobacter celer</i>	
<i>Thermovum composti</i>	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	

Tabla 8a. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos no identificados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	8974,82	48	186,975	74,04	0,0000
B:Repetición	9,76993	2	4,88497	1,93	0,1501
RESIDUOS	242,428	96	2,52529		
TOTAL (CORREGIDO)	9227,01	146			

Tabla 8b. Análisis de varianza para la variable Actividad Enzimática Específica en función de los factores Identidad y Repetición para los aislados proteolíticos no identificados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Identidad	6,52353	48	0,135907	49,75	0,0000
B:Repetición	0,0114653	2	0,00573265	2,10	0,1282
RESIDUOS	0,262268	96	0,00273196		
TOTAL (CORREGIDO)	6,79727	146			

Tabla 8c. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos no identificados.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
NO IDENTIFICADA 27	
NO IDENTIFICADA 11	
NO IDENTIFICADA 3	
NO IDENTIFICADA 31	
NO IDENTIFICADA 4	
NO IDENTIFICADA 21	
NO IDENTIFICADA 20	
NO IDENTIFICADA 40	
NO IDENTIFICADA 45	
NO IDENTIFICADA 5	
NO IDENTIFICADA 17	
NO IDENTIFICADA 18	
NO IDENTIFICADA 10	
NO IDENTIFICADA 12	
NO IDENTIFICADA 44	
NO IDENTIFICADA 6	
NO IDENTIFICADA 15	
NO IDENTIFICADA 29	
NO IDENTIFICADA 13	
NO IDENTIFICADA 37	
NO IDENTIFICADA 43	
NO IDENTIFICADA 24	
NO IDENTIFICADA 35	
NO IDENTIFICADA 1	
NO IDENTIFICADA 49	
NO IDENTIFICADA 28	
NO IDENTIFICADA 36	
NO IDENTIFICADA 22	
NO IDENTIFICADA 14	
NO IDENTIFICADA 8	
NO IDENTIFICADA 30	
NO IDENTIFICADA 16	
NO IDENTIFICADA 48	
NO IDENTIFICADA 38	
NO IDENTIFICADA 47	
NO IDENTIFICADA 33	
NO IDENTIFICADA 39	

Identidad	Grupos de Homogeneidad
NO IDENTIFICADA 19	
NO IDENTIFICADA 32	
NO IDENTIFICADA 23	
NO IDENTIFICADA 9	
NO IDENTIFICADA 42	
NO IDENTIFICADA 46	
NO IDENTIFICADA 25	
NO IDENTIFICADA 34	
NO IDENTIFICADA 41	
NO IDENTIFICADA 7	
NO IDENTIFICADA 2	
NO IDENTIFICADA 26	

Tabla 8d. Test de mínima diferencia significativa de Fisher para la variable Actividad Enzimática Específica en función del factor Identidad para los aislados proteolíticos no identificados.

Identidad	Grupos de Homogeneidad
NO IDENTIFICADA 27	
NO IDENTIFICADA 3	
NO IDENTIFICADA 11	
NO IDENTIFICADA 5	
NO IDENTIFICADA 31	
NO IDENTIFICADA 4	
NO IDENTIFICADA 45	
NO IDENTIFICADA 12	
NO IDENTIFICADA 21	
NO IDENTIFICADA 18	
NO IDENTIFICADA 10	
NO IDENTIFICADA 15	
NO IDENTIFICADA 49	
NO IDENTIFICADA 20	
NO IDENTIFICADA 40	
NO IDENTIFICADA 6	
NO IDENTIFICADA 24	
NO IDENTIFICADA 13	
NO IDENTIFICADA 48	
NO IDENTIFICADA 44	
NO IDENTIFICADA 22	
NO IDENTIFICADA 8	
NO IDENTIFICADA 28	
NO IDENTIFICADA 29	
NO IDENTIFICADA 17	
NO IDENTIFICADA 37	
NO IDENTIFICADA 9	
NO IDENTIFICADA 23	
NO IDENTIFICADA 43	
NO IDENTIFICADA 1	
NO IDENTIFICADA 36	

Identidad	Grupos de Homogeneidad
NO IDENTIFICADA 35	[]
NO IDENTIFICADA 30	[]
NO IDENTIFICADA 42	[]
NO IDENTIFICADA 38	[]
NO IDENTIFICADA 16	[]
NO IDENTIFICADA 7	[]
NO IDENTIFICADA 39	[]
NO IDENTIFICADA 2	[]
NO IDENTIFICADA 25	[]
NO IDENTIFICADA 32	[]
NO IDENTIFICADA 33	[]
NO IDENTIFICADA 14	[]
NO IDENTIFICADA 41	[]
NO IDENTIFICADA 26	[]
NO IDENTIFICADA 19	[]
NO IDENTIFICADA 46	[]
NO IDENTIFICADA 47	[]
NO IDENTIFICADA 34	[]