

Artículo Científico

Producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora

Aguirre-Félix Azalea Fernanda¹, Martínez-Pérez Raúl Balam¹✉, Villa-Lerma Alma Guadalupe¹♦, Rodríguez-Ramírez Roberto¹✉, Plascencia-Jatomea Rigoberto²✉, Figueroa-López Alejandro Miguel³✉

¹ Instituto Tecnológico de Sonora Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Ciudad Obregón, Sonora

² Instituto Tecnológico de Sonora. Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente. Ciudad Obregón, Sonora

³ Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis Departamento de Ciencias Naturales y Exactas. Los Mochis, Sinaloa, México.

♦ **Correspondencia:** alma.villa@itson.edu.mx

Área Temática:
Ciencias Ambientales

Recibido: 24 de mayo, 2025

Aceptado: 16 de julio, 2025

Publicado: 28 de julio, 2025

Cita: Aguirre-Félix AF, Martínez-Pérez RB, Villa-Lerma AG, Rodríguez-Ramírez R, Plascencia-Jatomea R, y Figueroa-López AM. 2025. Producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2509>



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: Los halófilos son microorganismos que se encuentran creciendo en ambientes con elevadas concentraciones de sal. En los últimos años se ha mostrado un creciente interés en el estudio de estos microorganismos por su gran potencial biotecnológico, principalmente en la obtención de enzimas de importancia en la industria. Las muestras analizadas fueron tomadas en puntos aleatorios de la costa de la Bahía de Santa Barbara, Sonora, México. Se identificó el crecimiento de 287 colonias en los medios de cultivo utilizados (agar marino 1217 y ATCC 2185) a concentraciones de NaCl de 0.5, 2 y 4 M, 35 colonias presentaron halo de hidrólisis en medio marino 0.5 M, 7 colonias en medio marino 1217 2 M y 4 colonias en medio ATCC 2185 2 M NaCl, todos enriquecidos con 2 % de leche descremada como inductor de la actividad proteolítica. Asimismo, se seleccionaron cinco cepas (5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11) en función de los mayores diámetros del halo de hidrólisis presentado en el medio con inductor. La determinación de la concentración de proteínas indicó que la cepa 5.3.8 presentaba la concentración más alta iniciando con 144.4555 µg/mL. Por otro lado, la mayor actividad proteolítica se identificó a partir de las 144 horas del proceso fermentativo, siendo la cepa 5.3.3 la que mostró la mayor actividad. Específicamente se encontraron actividades enzimáticas de: 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323 y 0.2035 U/mL para las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11. Estos resultados sugieren la presencia de cepas halófilas leves aisladas de suelos salinos con capacidad de producir proteasas con potencial biotecnológico.

Palabras clave: Halófilos, fermentación, enzimas, actividad proteolítica

Abstract: Halophiles are microorganisms that inhabit environments with high salt concentrations. In recent years, there has been growing interest in studying these microorganisms due to their biotechnological potential, particularly in the production of enzymes with industrial relevance. Samples were collected at Bahía de Santa Barbara, Sonora, Mexico. A total of 287 colonies were grown on Marine agar 1217 and ATCC 2185 agar at NaCl concentrations of 0.5, 2 and 4 M, 35 colonies showed hydrolysis halos on 0.5 M marine medium, 7 on 2 M marine medium, and 4 on 2 M ATCC 2185 medium, all of them supplemented with 2% skim milk as a proteolytic activity inducer. Five strains (5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8, and 4.2.11) were selected based on the size of the diameter of the hydrolysis halo observed on the inducer-containing medium. Protein concentration analysis indicated that strain 5.3.8 exhibited the highest concentration (144.46 µg/mL) since the beginning of fermentation. Proteolytic activity was detected specifically after 144 hours of fermentation, where strain 5.3.3 was the one showing the highest proteolytic activity. Enzymatic activity levels were 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323, and 0.2035 U/mL for strains 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8, and 4.2.11, respectively. These results suggest that slightly halophilic strains from saline soils were isolated representing a promising source of proteolytic enzymes with biotechnological potential.

Keywords: Halophiles, fermentation, enzymes, proteolytic activity

INTRODUCCIÓN

Se conoce como organismos extremófilos a aquellos cuya característica es la de poder desarrollarse en ambientes con condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, etc (Reang et al., 2024; Fahmy y El-Deeb, 2023). Dentro de este grupo se encuentran los halófilos, los cuales son microorganismos con la capacidad de desarrollarse en entornos con altas concentraciones de sal (Ruginescu et al., 2020) tales como suelos salinos, lagos salados, agua de mar, entre otros (Hardin y Simpson, 2018).

Los microorganismos halófilos pueden clasificarse según su requerimiento de cloruro de sodio (NaCl) en 3 grandes grupos: halófilos leves, que crecen óptimamente en concentraciones de 0.2-0.85 M (1-5 %) de NaCl, halófilos moderados, cuyo crecimiento óptimo ocurre entre 0.85-3.4 M (5-20 %) NaCl y halófilos extremos que se desarrollan en concentraciones de 3.4-5.1 M (20-30 %) NaCl (Abs Samad et al., 2017). Sin embargo, algunos autores han propuesto clasificaciones intermedias como, por ejemplo, Harding y Simpson (2018) quienes sugieren la categoría de halófilos limítrofes extremos (*borderline extreme halophiles*), que se caracterizan por desarrollarse en concentraciones de sal entre 1.5-4.0 M (9-24 %).

Se han identificado diversos microorganismos representativos de los tres dominios (Bacteria, Archaea y Eukarya) que pueden encontrarse en cada uno de los grupos de halófilos categorizados (Ruginescu et al., 2020). Entre las bacterias halófilas extremas destacan géneros como *Salinibacter* y *Bacillus*. En el caso de eucariotas, se han documentado especies de algas verdes como *Dunaliella*, así como diversas levaduras y hongos. Dentro de estos últimos se incluyen *Hortaea werneckii* y *Aureobasidium pullulans*, además de especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. También se han registrado hongos filamentosos como *Wallemia ichthyophaga*, junto con protozoarios halófilos como *Halocafeteria seosinensis* (Ruginescu et al., 2020; Revankar et al., 2024; Chung et al., 2021).

La capacidad de los microorganismos halófilos para sobrevivir en condiciones hipersalinas se atribuye a una serie de adaptaciones fisiológicas, entre las que destacan dos estrategias principales: el uso de solutos compatibles y la acumulación de cloruro de potasio (KCl) en el citoplasma. El primer mecanismo implica la acumulación de grandes concentraciones de solutos orgánicos compatibles en el citoplasma, como la betaína para proporcionar un equilibrio osmótico a la célula, excluyendo lo más posible las sales del citoplasma (Deole y Hoff, 2020). Por otro lado, el segundo mecanismo involucra la acumulación intracelular de KCl tanto o más que las concentraciones de NaCl del medio para mantener un equilibrio osmótico. Si bien, esta última adaptación requiere un gasto energético moderado para la célula, supuso un cambio evolutivo de los microorganismos a nivel proteoma por las altas concentraciones de KCl, confinándolos así a hábitats hipersalinos (Reang et al., 2024).

Estas adaptaciones no solo permiten la supervivencia de los microorganismos halófilos, sino que también influyen en su metabolismo, incluyendo la producción de enzimas funcionales bajo condiciones extremas. Debido a ello, estos microorganismos extremófilos producen enzimas de gran interés conocidas como haloenzimas, las cuales poseen la capacidad de soportar condiciones desfavorables tales como altas concentraciones de sal, pH alcalinos extremos y temperaturas elevadas, en comparación con las enzimas mesófilas (Reang *et al.*, 2024). Entre ellas, destacan las proteasas, enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos, mostrando gran estabilidad incluso frente estas condiciones adversas (Raval *et al.*, 2015; Abd Samad *et al.*, 2017). Estas propiedades las convierten en herramientas de gran valor para procesos como la producción de detergentes, curtido de cuero, procesamiento de alimentos y la producción de hidrolizados de interés (Wang *et al.*, 2009; Sarwa *et al.*, 2024).

Dada su importancia industrial, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre la obtención de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos extremos (Khoshnevis *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2021; Benmebarek y Kharroub, 2023). Sin embargo, la producción a gran escala de este tipo de enzimas aún presenta limitaciones en comparación con otras extremoenzimas, principalmente debido a desafíos como la corrosión de los equipos ocasionada por las altas concentraciones salinas requeridas durante los cultivos (Mesbah, 2022).

En este contexto, y considerando la necesidad de identificar cepas nativas con potencial enzimático, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

Las muestras de suelo fueron tomadas en puntos aleatorios de la costa de la Bahía de Santa Barbara, Sonora, México, con coordenadas: 26° 41' 8" N, 109° 36' 3" W. Posteriormente se transportaron al laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología enzimática del Instituto Tecnológico de Sonora en refrigeración y se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento.

Aislamiento y cultivo

El aislamiento de los microorganismos halófilos se llevó a cabo a partir de diluciones seriadas de siete muestras de suelo. Para ello se prepararon tubos de ensayo con 9 mL de soluciones salinas a concentraciones de 0.5, 2 y 4 M de NaCl, previamente esterilizadas. Se sembraron 100 µL de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) en placas de Agar Marino 1217 que contenía: 0.0016 g de nitrato amónico, 0.022 g ácido bórico, 0.008 g fosfato disódico, 0.08 g bromuro de potasio, 0.16 g

bicarbonato sódico, 0.0024 g fluoruro de sodio, 3.24 g sulfato de sodio, 1 g de extracto de levadura, 5 g peptona, 1.8 g cloruro cálcico, 8.8 g cloruro magnésico anhidro, 0.55 g cloruro potásico, 19.4 g cloruro sódico, 0.004 g silicato sódico, 0.034 g cloruro de estroncio, 0.1 g citrato férrico, de acuerdo a la ficha técnica de Conda-lab (2020) y 15 g de agar bacteriológico por litro, ajustando a pH 7.4 con NaOH 1 M; y medio ATCC 2185 que contenía: 234 g NaCl, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de citrato trisódico, 2 g KCl, 5 g de triptona, 3 g de extracto de levadura, 15 g de agar bacteriológico por litro; y 1 mL de solución traza (conteniendo: 6.6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.9 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.7 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por mL), ajustando a pH 6.5 con NaOH 1 M, ambos preparados con las mismas concentraciones de NaCl (0.5, 2 y 4 M), según Martín del Campo *et al.* (2015). Posteriormente se incubaron a 40 °C, durante 72 horas.

Aquellas colonias que mostraron un crecimiento considerable se sembraron por picadura en agar marino 1217 y ATCC 2185, adicionado con 0.5, 2 y 4 M de NaCl y enriquecidos con leche descremada al 2 % (Difco™) como inductor de la actividad proteolítica para posteriormente evaluar los halos de inhibición desarrollados en el medio de cultivo enriquecido, seleccionando las 5 cepas con mayores halos de hidrólisis.

Fermentación en medio líquido

Se llevó a cabo una fermentación en medio líquido utilizando las cepas seleccionadas. En donde se utilizó un volumen total de 50 ml con 5% de inóculo, el medio de cultivo empleado fue Medio Marino 1217 con 0.5 M de NaCl. La fermentación se realizó durante 144 horas a 40 °C, bajo agitación constante a 180 rpm en un incubador orbital.

Se tomaron muestras cada 24 horas, las cuales se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para separar el sobrenadante, el cual fue utilizado posteriormente para la determinación de la actividad proteolítica y la concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteína presente a lo largo de la fermentación mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar una curva patrón de BSA (2.5-15.0 µg/mL; $R^2 > 0.99$).

Determinación de actividad proteolítica

La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la metodología de Camacho *et al.*, (2023) y Martínez-Pérez *et al.*, (2019), utilizando como indicador rojo fenol 0.35 mM. La absorbancia fue leída a 558 nm en un espectrofotómetro UV-VIS MultiSkan Go (Thermo Scientific™, Estados Unidos), realizando la medición de

la absorbancia cada 30 segundos por 15 minutos, utilizando una curva patrón preparada con HCl disuelto en buffer libre de sustrato (0.2-0.7 mM; $R^2 > 0.99$). Así mismo se utilizó la ecuación 1 para la cuantificación proteolítica:

$$\frac{U}{mL} = \frac{Rm - Rb \cdot 120 \cdot FD}{Rs \cdot 20}$$

Dónde:

Rm= Pendiente de reacción de la muestra en ABS/min,

Rb= Pendiente de reacción del blanco en ABS/min,

Rs= Pendiente de la curva estándar en ABS/min,

FD= Factor de dilución de la muestra,

Siendo 120 μ L el volumen de reacción y 20 μ L el volumen de la muestra empleado.

RESULTADOS

Mediante el uso de dos medios diferentes (agar marino 1217 y ATCC 2185) se lograron purificar 287 cepas con condiciones de requerimiento diferentes de NaCl (0.5, 2 y 4 M). Sin embargo, para posteriores ensayos, solo se consideraron aquellas colonias cuya coloración, forma y textura fuesen distintas, ya que la caracterización morfológica de distintas colonias refleja diferencias fenotípicas, lo que provee de información acerca de la diversidad microbiana en las muestras, por lo tanto, con esto se pretendía maximizar la probabilidad de trabajar con microorganismos distintos (Sousa *et al.*, 2013). De esta manera, se conservaron 85 colonias en medio marino 1217 0.5 M NaCl, 38 en medio marino 1217 2 M NaCl, 3 colonias en medio ATCC 2185 con 4 M de NaCl y 31 en medio ATCC 2185 2 M de NaCl, cabe mencionar que no se encontró crecimiento en el medio marino con 4 M de NaCl, lo cual sugiere la presencia de únicamente microorganismos halófilos ligeros y moderados.

Se identificaron 35/85 colonias con la capacidad de producir exoenzimas proteolíticas en medio marino con 0.5 M NaCl, 7/38 colonias en medio marino con 2 M de NaCl y 4/31 colonias en medio ATCC 2185 con 2 M de NaCl, los cuales fueron enriquecidos con 2% de leche descremada como inductor para detectar la síntesis de proteasas extracelulares. De acuerdo con Tennalli *et al.*, (2024), la formación de un halo de hidrólisis cristalino alrededor de las colonias se interpreta como evidencia de la actividad proteolítica. Con base en el diámetro del halo de hidrólisis fueron seleccionadas 5 cepas: 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11 (Figura 1 y Archivo Complementario).

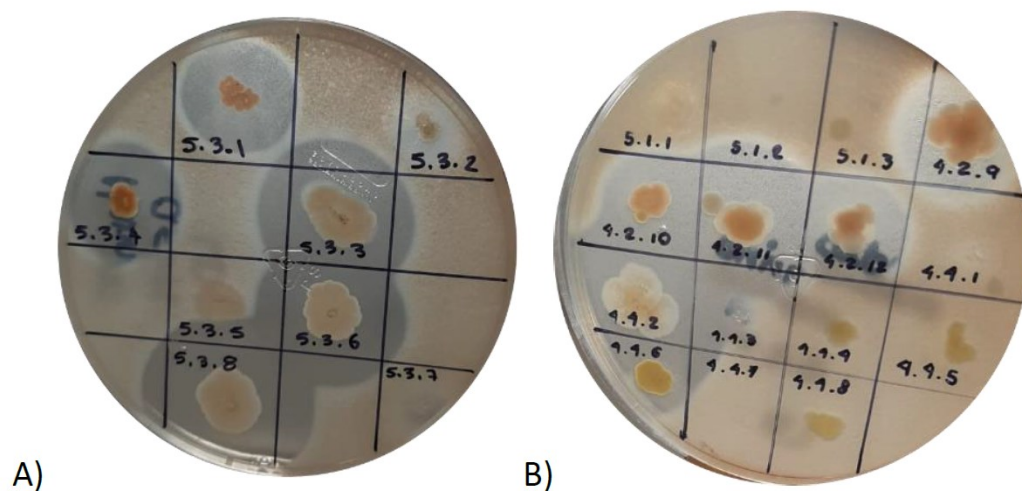


Figura 1. Crecimiento microbiano de **A.** cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y **B.** 4.2.11 medio marino 0.5 M NaCl enriquecido con leche descremada 2 %. La aparición del halo de hidrólisis (cristalino) alrededor de las cepas en el medio con inductor, indica la degradación de la caseína en péptidos y aminoácidos solubles, evidenciando la síntesis de enzimas proteolíticas extracelulares.

Previo la fermentación líquida se prepararon inóculos con las cepas seleccionadas las cuales fueron monitoreadas mediante la densidad óptica tras 24 horas de incubación a 40 °C y 180 rpm, en medio marino 1217 0.5 M (Archivo complementario).

La concentración de proteínas presentó una disminución progresiva a lo largo del tiempo, durante la fermentación con medio marino 1217 0.5 M a 40 °C y 180 rpm en todas las cepas evaluadas. Al inicio de la fermentación, la cepa 5.3.8 mostró la concentración más alta (144.4555 µg/mL), mientras que la 5.3.3 presentó las concentraciones más bajas en el tiempo 0 h (110.6348 µg/mL). Al final de la fermentación las cepas 5.3.3 y 5.3.4 presentaron las menores concentraciones de proteína (52.5594 y 43.4963 µg/mL) respectivamente (Figura 2).

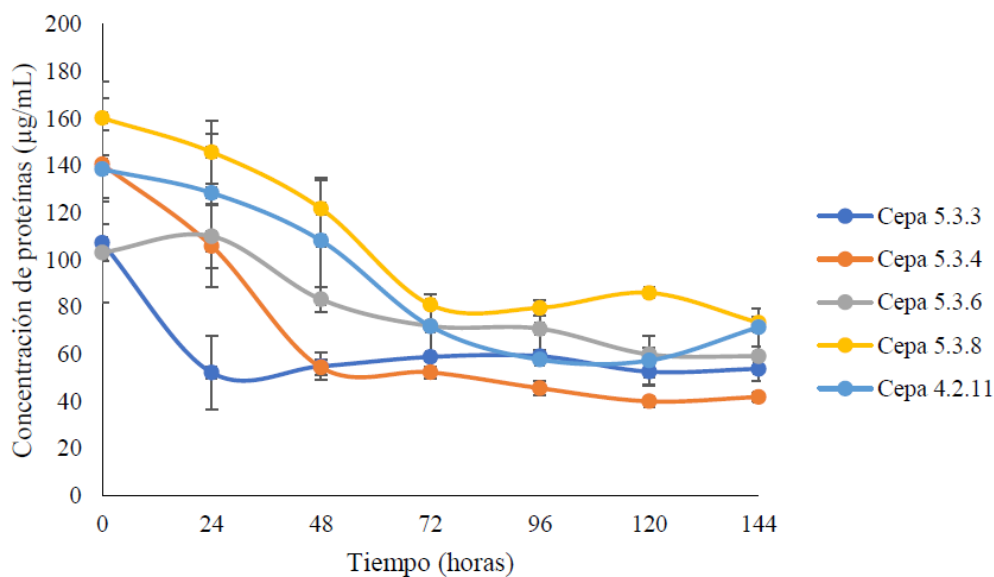


Figura 2. Determinaciones de la concentración de proteína en fermentación líquida en medio marino 1217 0.5 M de NaCl a 180 rpm y 40 °C.

Durante las primeras horas de fermentación no fue posible identificar actividad proteolítica, sino hasta las 120 horas, sin embargo, la actividad proteolítica máxima se presentó a las 144 horas. En la Figura 3 se observa la cinética de hidrólisis de caseína, utilizando extractos enzimáticos de las cepas incubadas (5.3.3, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11), siendo la cepa 5.3.6 la que presentó la actividad relativa más alta con respecto a las demás evaluadas.

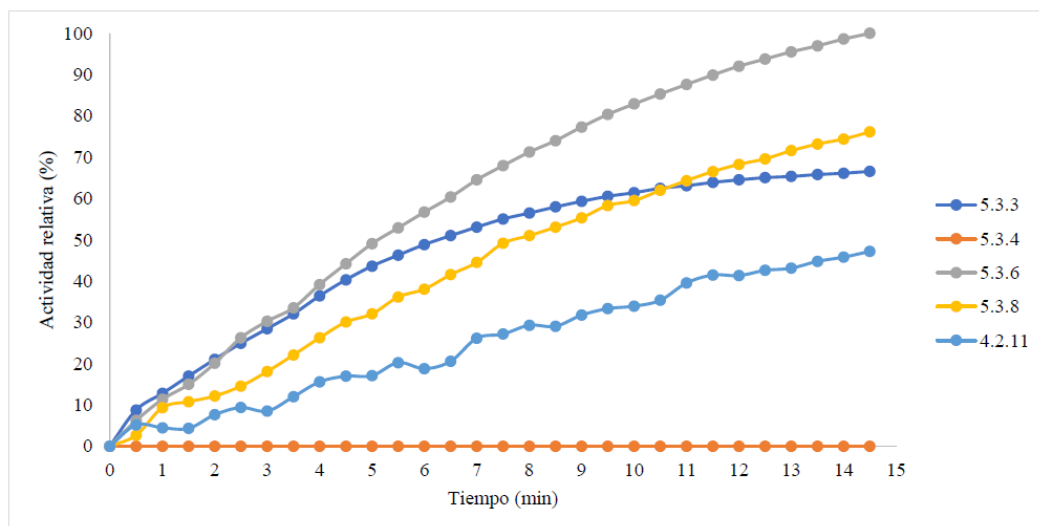


Figura 3. Actividad proteolítica relativa de las cinco cepas seleccionadas durante 15 minutos de incubación. Los valores fueron normalizados tomando como 100 % la actividad máxima observada en todas las muestras. La cinética se evaluó por

espectrofotometría a 558 nm, utilizando caseína como sustrato proteico. Las curvas muestran el comportamiento enzimático de cada cepa bajo condiciones idénticas de cultivo y reacción: medio marino 1217 0.5 M de NaCl, 180 rpm y 40 °C.

En contraste, en la cepa 5.3.4 no se registró actividad proteolítica, evidenciado por la planitud de la curva presentada, lo cual es indicativo de una nula actividad proteolítica. Por otro lado, la actividad enzimática calculada a las 144 horas fue de: 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323 y 0.2035 U/mL para las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11, respectivamente (Figura 4).

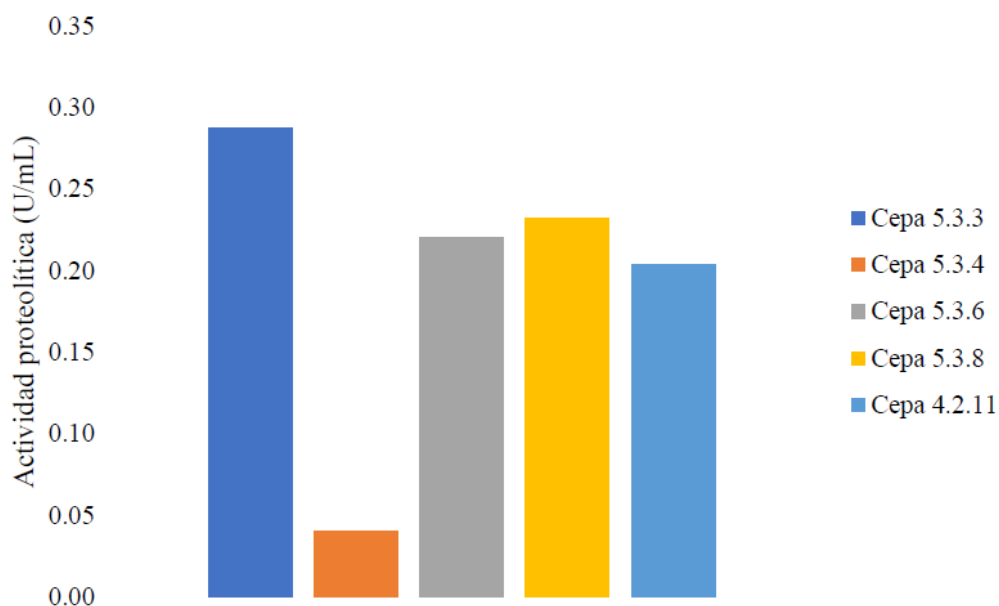


Figura 4. Actividad de las cepas evaluadas a las 144 horas, durante la fermentación líquida en medio marino 1217 0.5 M a 180 rpm y 40 °C.

DISCUSIÓN

La identificación de las colonias productoras de enzimas proteolíticas fue mediante la aparición de un halo cristalino alrededor de éstas, en el medio enriquecido al 2% con leche descremada, confirmando así la presencia de actividad proteolítica extracelular (Santos y Villalta, 2015). La principal proteína presente en la leche es la caseína y esta se encuentra en suspensión coloidal, de manera que, aporta turbidez al medio. En particular, la secreción de enzimas proteasas extracelulares permite la hidrólisis de la caseína en péptidos solubles, reduciendo la turbidez del medio y generando un halo cristalino alrededor de las colonias. Este halo es un indicador visual de la actividad proteolítica y confirma la capacidad de los microorganismos de producir enzimas proteasas extracelulares (Fitriyanto *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2021)

La concentración de proteínas de las muestras durante la fermentación fue en decremento desde las 0 h hasta las 144 h. Este comportamiento sugiere que los

microorganismos cultivados secretaron enzimas proteolíticas para aprovechar las proteínas de la leche descremada utilizada como inductor. Se ha documentado que medios de cultivo enriquecidos con leche descremada induce la síntesis de proteasas que hidrolizan la proteína presente del medio (caseína), lo que explica la disminución progresiva en la concentración proteica durante la fermentación, pues la proteína es degradada a péptidos y aminoácidos (Lario et al., 2020; Kamath et al., 2010).

A las 144 horas de fermentación hubo evidencia de una mayor actividad proteolítica en las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11, con respecto a las 120 horas. En particular, la cepa 5.3.3 mostró mayor actividad (0.2875 U/mL). Pero en contraste, no se detectó actividad proteolítica en el sobrenadante del cultivo líquido de la cepa 5.3.4., sin embargo, ésta si presentó halo de hidrólisis al sembrarse en agar medio marino 0.5 M con leche descremada, lo que indica que si había producción enzimática extracelular (proteasas). Lo anterior sugiere que la cepa es capaz de sintetizar proteasas, pero la secreción de estas enzimas puede depender de las condiciones propias del medio, como la concentración de salinidad, el pH, la temperatura o incluso la agitación (Saini et al., 2023). Si bien, la actividad absoluta cuantificada reflejó que la cepa 5.3.3 produjo una mayor concentración enzimática, existe una discrepancia entre la actividad relativa presentada en la cinética, pues, la cepa 5.3.6 mostró una mayor eficiencia sostenida en la hidrólisis de caseína, a lo largo del tiempo. Resultados similares fueron descritos por Martínez-Pérez et al., (2020), quienes evaluaron la producción de proteasa extracelular en cepas halófilas, usando caseína como sustrato. En su estudio, se observó variabilidad en la cinética de hidrólisis y del cual se sugiere que estas diferencias se deben principalmente a la eficiencia catalítica específica de las enzimas y su afinidad por el sustrato, pero también reflejan la diversidad metabólica microbiana halófila.

Del total de cepas evaluadas (287), solo el 53.65 %logró crecer en los medios marino (0.5 M y 2 M de NaCl) y medio ATCC (2 M de NaCl), y un menor porcentaje de las cepas se identificaron con actividad proteolítica (46/287 cepas o 16.0278 %), evidenciada por la formación de los halos de hidrólisis. Algunos estudios han demostrado que ambientes salinos como los suelos costeros, albergan una gran diversidad de microorganismos halófilos (Drissi-Kaitouni et al., 2020; Irshad et al., 2014). En particular, se han identificado distintos géneros, de los cuales destacan *Bacillus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Shewanella*, *Salinivibrio*, entre otros, y de los cuales muchos presentan la capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas de interés industrial, como las proteasas. No obstante, se ha observado que dicha diversidad microbiana tiende a disminuir conforme aumenta la concentración de sal en los medios, encontrándose más cepas aisladas en medios con concentraciones bajas a moderadas (3-9 %) de NaCl y solo unas pocas en concentraciones por encima del 20 % de NaCl (Irshad et al., 2014).

Asimismo, aunque algunas cepas aisladas en el estudio no mostraron actividad enzimática proteolítica, los valores obtenidos fueron significativamente menores en

comparación con otros estudios. Por ejemplo, Alnahdi (2012) registró actividades entre 55 y 243 U/mL, mientras que en este caso la actividad máxima la presentó la cepa 5.3.3 con 0.2875 U/mL a las 144 horas, no obstante, las condiciones de temperatura y agitación (28 °C, 180 rpm) fueron distintas a la del presente estudio, lo que puede explicar la diferencia entre las actividades enzimáticas obtenidas en ambos casos. Por otro lado, Ghasemi *et al.*, (2011), reportaron actividad enzimática proteolítica en un rango similar a las encontradas en este estudio, siendo entre 0.01 y 0.43 U/mL bajo condiciones de 37 °C y 150 rpm. Si bien estos últimos se acercan más a las concentraciones obtenidas, se evidencia que la actividad enzimática detectada no solo se atribuye a la diversidad microbiológica entre las cepas en sí, sino también de si las condiciones del entorno son o no favorables para la síntesis de enzimas proteolíticas Rolfe *et al.*, (2012).

En ambientes hipersalinos, por lo general, se presenta baja disponibilidad de nutrientes simples como el nitrógeno y carbono. Por lo que la producción de proteasas extracelulares por parte de los microorganismos halófilos representa una estrategia adaptativa para la obtención de nutrientes. Estas enzimas permiten no solo la degradación de proteínas presentes en el entorno en péptidos y aminoácidos (Hong *et al.*, 2023; Mokashe *et al.*, 2018), sino que además pueden conferir una ventaja competitiva frente a otros microorganismos al tener la capacidad de lisar células que coexisten en el entorno, utilizando como nutrientes los restos celulares (Hong *et al.*, 2023).

Estructuralmente hablando, las proteasas halófilas poseen adaptaciones específicas que aseguran su función bajo condiciones extremas. Estas incluyen: mayor número de residuos de aminoácidos ácidos en la superficie de la enzima, parches hidrofóbicos de menor tamaño y puentes salinos entre los residuos ácidos-básicos, lo que permite mantener una capa de hidratación funcional sobre ésta, pero además se ha demostrado que amplían su versatilidad y adaptación en términos de resistencia a pH alcalinos y temperaturas elevadas bajo estrés osmótico (Edbeib *et al.*, 2016), incluso evitando la desnaturalización en presencia de agentes desnaturalizantes (Sinha y Khare, 2014).

Por lo anterior, la actividad proteolítica observada en las cepas evaluadas no solo refleja su capacidad enzimática, sino también su grado de adaptación a las condiciones impuestas del proceso fermentativo (medio de cultivo, salinidad, pH, temperatura y agitación). La ausencia de actividad enzimática en el medio líquido por parte de la cepa 5.3.4 podría deberse a que requiere condiciones distintas en la fermentación o que no se alcanzaron concentraciones suficientes para ser cuantificada por el ensayo. Asimismo, como señalan Mokashe *et al.*, (2018), muchas enzimas halófilas muestran diferencias significativas de expresión y síntesis entre condiciones de cultivo en medios sólidos y líquidos, lo cual explica que se haya identificado un halo de hidrólisis en la cepa 5.3.4 sembrada en agar medio marino 0.5 M con inductor, pero no se haya logrado cuantificar actividad enzimática en el medio líquido.

CONCLUSIONES

Las cepas halófilas aisladas de suelos salinos fueron capaces de producir enzimas proteolíticas bajo las condiciones de cultivo utilizadas en el presente trabajo de investigación. El contenido de proteína en el medio de cultivo presentó un comportamiento descendiente, lo que indicó el consumo de la proteína presente en el sustrato. Asimismo, se determinó la actividad proteolítica de cada muestra, presentando actividad enzimática en las últimas etapas de la fermentación, siendo la cepa 5.3.3 la que mostró mayores valores de actividad con respecto a las demás. Por otro lado, la cepa 5.3.4 es un caso de relevancia, puesto que los resultados sugieren que la evaluación de la actividad enzimática solo en medio líquido podría subestimar su potencial proteolítico real.

Los resultados que se obtuvieron muestran que, de las 287 cepas aisladas, únicamente poco más de la mitad logró crecer en 3 de los cuatro medios salinos evaluados (medio marino 0.5 M, 2 M y ATCC 2 M de NaCl), y solo el 16.03 % presentó actividad enzimática proteolítica. Las cepas que fueron seleccionadas para los ensayos de fermentación fueron aquellas que mostraron dicha actividad, reflejando no solo su capacidad funcional en entornos salinos, sino también la amplia diversidad contenida en suelos salinos, incluyendo microorganismos cuyo potencial no solo depende de las condiciones de salinidad, sino también de condiciones más específicas como la temperatura y agitación, como se sugiere con la cepa 5.3.4., por lo que se recomienda optimizar las condiciones de fermentación (agitación, temperatura y tiempo de cultivo) para potenciar la síntesis de proteasas.

Conflicto de Interés

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés

REFERENCIAS

- Abd Samad, N. S., Amid, A., Jimat, D. N., and Shukor, N. A. 2017. Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease. *Science Heritage Journal*, 1(1), 7-9. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2017.07.09>
- Alnahdi, H. S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 071-074. DOI:10.7324/JAPS.2012.2915
- Benmebarek, H., and Kharroub, K. 2023. Production Assay and Partial Characterization of a Protease Produced by *Idiomarina loihiensis*, a Moderately Halophilic Bacterium Strain. In *Biology and Life Sciences Forum* (Vol. 31, No. 1, p. 18). MDPI.
- 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(1-2), 248-254.
- Camacho, R. M., Martínez, R., B. and Camacho, M. 2023. Cuantificación de proteasas haloalcalinas empleando un método cinético basado en pH. *Manual de métodos para el estudio de extremófilos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. DOI: 10.30973/2023/manual-extremofilos
- Chung, D., Yu, W. J., Lim, J. Y. et al. 2021. Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern. *Microorganisms*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
- Chung, D., Yu, W. J., Lim, J. Y., Kang, N. S., Kwon, Y. M., Choi, G., ... and Lee, D. S. 2021. Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern. *Microorganisms*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
- Condalab. (2020). Ficha técnica: Caldo Marino Cat. 1217. <https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/984-11616-marine-broth.html>
- Deole, R. and Hoff, W. D. 2020. A potassium chloride to glycine betaine osmoprotectant switch in the extreme halophile *Halorhodospira halophila*. *Sci Rep* 10, 3383. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59231-9>

- Drissi-Kaitouni, L.B., Anissi, J., Sendide, K. *et al.* 2020. Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Ann Microbiol* 70, 33. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01570-z>
- Edbeib, M.F., Wahab, R.A. and Huyop, F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Fahmy, N. M., and El-Deeb, B. 2023. Optimization, partial purification, and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by *Halobacillus sp.* HAL1 using fish wastes as a substrate. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00509-6>
- Fitriyanto, N. A., Hadi, S., Bahtiyar, M. I., Prasetyo, R. A., and Erwanto, Y. 2020. Characterization and growth profile of proteolytic strain PK-4 isolated from local slaughterhouse wastewater. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 28, p. 03001). *EDP Sciences*. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202803001>
- Ghasemi, Y., Rsoul, A. S., Ebrahimimezhad, A., Kazemi, A., Shahbazi, M., and Talebnia, N. 2011. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo Salt Lake. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3): 175-180. <https://www.sid.ir/paper/300324/en>
- Hong, T., Pan, R., Ke, J. *et al.* 2023. Expression, purification, and enzymatic characterization of an extracellular protease from *Halococcus salifodinae*. *Braz J Microbiol* 54, 2689–2703. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01114-y>
- Hou, J., Yin, X. M., Li, Y., Han, D., Lü, B., Zhang, J. Y., and Cui, H. L. 2021. Biochemical characterization of a low salt-adapted extracellular protease from the extremely halophilic archaeon *Halococcus salifodinae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.081>
- Irshad, A., Ahmad, I., and Kim, S. B. 2014. Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 563-572. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000050>
- Kamath, P., Subrahmanyam, V. M., Rao, J. V., and Raj, P. V. 2010. Optimization of cultural conditions for protease production by a fungal species. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(2), 161. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.65017>
- Karan, R., Kumar, S., Sinha, R., and Khare, S. K. 2011. Halophilic Microorganisms as Sources of Novel Enzymes. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, 555–579. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9_25
- Khoshnevis, N., Rezaei, S., Samaei-Nouroozi, A., Amin, M., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., and Faramarzi, M. A. 2018. Enhanced production and characterization of a highly stable extracellular protease from an extreme halophilic isolate *Salicola marasensis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(4), 1392. PMID: 30568698
- Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Sette, L. D., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., and Pessoa, A. 2020. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, 28, e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>
- Lim, Y., Foo, H., Loh, T. *et al.* 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *J Animal Sci Biotechnol* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z>
- Martin del Campo, M., Camacho, R. M., Mateos-Díaz, J. C., Müller-Santos, M., Córdova, J., and Rodríguez, J. A. 2015. Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles*, 19, 1121-1132.
- Martínez-Pérez, R. B., Camacho-Ruiz, M. A., Estrada-Alvarado, I., Armenta-Pérez, V., and Camacho-Ruiz, R. M. 2019. Time-efficient pH-based method to quantify the activity of alkaline and halo-alkaline proteases. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1063-1071. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Martinez>
- Martínez-Pérez, R.B., Rodríguez, J.A., Cira-Chávez, L.A. *et al.* 2020. Exoenzyme-producing halophilic bacteria from the former Lake Texcoco: identification and production of n-butyl oleate and bioactive peptides. *Folia Microbiol* 65, 835–847. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00794-5>
- Mesbah, N. M. 2022. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 870083. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870083>
- Mokashe, N., Chaudhari, B., and Patil, U. 2018. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International journal of biological macromolecules*, 117, 493-522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.217>
- Raval, V.H., Purohit, M.K. and Singh, S.P. 2015. Extracellular proteases from halophilic and haloalkaliphilic bacteria: occurrence and biochemical properties. In: Maheshwari, D., Saraf, M. (eds) *Halophiles. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 6. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2_16
- Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R.S. *et al.* 2024. Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria isolated from crop rhizospheric soils of Southwest Saurashtra Gujarat. *Sci Rep* 14, 15704. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63581-z>
- Revankar, S., Rathod, J. and Arakera, S. 2024. Screening of a halotolerant *Bacillus* species for protease production from Kali Estuary. *Journal of Advanced Zoology*, 45(2), 1820-1824.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S. *et al.* 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194(3), 686-701. <https://doi.org/10.1128/jb.06112-11>
- Ruginescu, R., Gomoiu, I., Popescu, O., *et al.* 2020. Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms*, 8(12), 1903. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121903>

- Saini, A., Kumar, A., Singh, G., and Giri, S. K. 2023. Survival strategies and stress adaptations in halophilic Archaeobacteria. In *Microbial stress response: mechanisms and data science* (pp. 1-21). American Chemical Society. DOI: 10.1021/bk-2023-1434.ch001
- Santos, J., and Villalta, J. 2015. La Halotolerancia y síntesis enzimática en *Pseudomonas cf. fluorescens* aislada de las piscinas de Ecuasal, provincia de Santa Elena, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 9(1), 5-5. <https://doi.org/10.53591/cna.v9i1.235>
- Sarwa, N., Kumari, P., Meena, D. *et al.* 2024. Alkaline proteases from haloalkaliphiles: unveiling nature's catalysts for diverse applications. *Appl Biochem Microbiol* 60, 855–870. <https://doi.org/10.1134/S0003683824603676>
- Sinha, R., Khare, S.K. 2014. Structural changes in halophilic and non-halophilic proteases in response to chaotropic reagents. *Protein J* 33, 394–402. <https://doi.org/10.1007/s10930-014-9571-0>
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., and Pereira, M. O. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Tennalli, G. B., Hungund, B. S., and Jain, A. M. 2024. Response surface methodology mediated optimization of serine protease by *Salinicola tamaricis* BGN2 isolated from the West Coast of India and its application in culturing of MCF7 cell line. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(3), 119-135. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.162421>
- Wang, S.-L., Chao, C.-H., Liang, T.-W., and Chen, C.-C. 2009. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Marine Biotechnology*, 11, 334-344. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9149-y>