

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

**Caracterización bioquímica de la α -amilasa (AmiJ33)
de *B. amyloliquefaciens* y su capacidad de hidrólisis
sobre almidón nativo comercial**

Tesis

Que para obtener el grado de:
Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Sarahi del Carmen Hernández Heredia

Asesor de tesis

Dra. Sandra T. del Moral Ventura

Co-Asesor de tesis

Dr. Alejandro Aparicio Saguilán



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

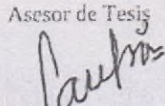
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 11 de Enero del 2016 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada Caracterización bioquímica de la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* y su capacidad de hidrólisis en almidón nativo comercial presentado por la alumna Sarahi del Carmen Hernández Heredia, con número de matrícula 10090014, aspirante al grado de Licenciatura.

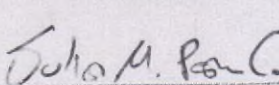
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

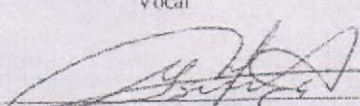
Tuxtepec, Oax., a 8 de Enero del 2016.

ATENTAMENTE.
LA COMISIÓN REVISORA

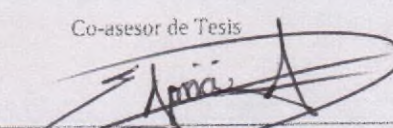
Asesor de Tesis


Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura
Profesor-Investigador
Presidente

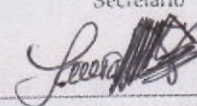

Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor-Investigador
Vocal


Dra. Guadalupe Aguilar Uscanga
Profesor-Investigador

Co-asesor de Tesis


Dr. Alejandro Aparicio Saguilán
Profesor-Investigador

Secretario


Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño
Profesor-Investigador



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Oficio No. JCIB/001/16

Tuxtepec, Oaxaca a 15 de Enero del 2016.

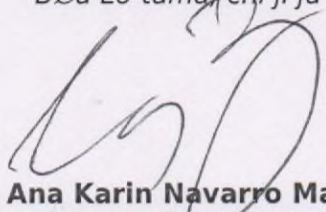
Lic. Yessenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la **impresión** del trabajo de tesis de la alumna **Sarahi del Carmen Hernández Heredia** titulado **"Caracterización bioquímica de la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* y su capacidad de hidrólisis en almidón nativo comercial"**. Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú


Dra. Ana Karin Navarro Martinez
Jefe de Carrera de
Ingeniería en Biotecnología



JEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

c.c.p. M.C. Héctor López Arjona. Vice-Rector Académico. Para su conocimiento.
c.c.p. Dra. Sandra Trinidad Del Moral Ventura, Asesor de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Sarahi del Carmen Hernández Heredia, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la **Universidad del Papaloapan**, campus Tuxtepec, bajo la dirección de la **Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura** y el **Dr. Alejandro Aparicio Saguilán**.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (Nº de becario 21841), a través del proyecto 154683.



NUNCA

Consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el bello
y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, él que me ha dado fortaleza para continuar cuando he estado a punto de abandonar todo. A mi madre, Cecilia Heredia Narciso, que me ha enseñado a luchar en la vida y a no rendirme sin antes haber dado todo de mí. A mi padre Jorge Hernández Baraja que me ha enseñado a nunca bajar los brazos aun en las situaciones más difíciles. A mis dos hermanos Jorge y Alain, que ven en mí un ejemplo a seguir. A mis cuatro abuelos Jorge, Alicia, Josefina y Genaro por sus sabios consejos y mágicas historias. A mi bisabuela Carmen que guía mi camino desde el cielo. A mi tía Teresa por esperarme cada vacaciones en la puerta de su casa para darme la bienvenida y por preguntar por mí aun en sus últimos días.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo de mis directores: La Dra. Sandra T. del Moral Ventura y el Dr. Alejandro Aparicio Saguilan, agradezco de ante mano su tiempo brindado y sus conocimientos, de igual manera agradezco la confianza depositada en mí.

Especialmente quiero agradecerle a mi Directora de tesis la Dra. Sandra T. del Moral Ventura por su ayuda en cada problema con los experimentos, por la enseñanza que me proporcionó a nivel académico y personal durante los cuatro años que tuve la oportunidad de trabajar con ella, porque aun en los momentos más difíciles en la universidad nunca dejó que me rindiera, sus consejos los llevaré siempre presente. No sé si esto sea un adiós o un hasta pronto, pero de lo que si estoy segura es que aprendí mucho y gracias a sus conocimientos he llegado a formarme.

Agradezco a la Universidad del Papaloapan, en especial al laboratorio de Biología Molecular y a todos los que trabajamos ahí, aprendí y disfrute mucho de ese ambiente.

Agradezco de todo corazón a mis padres por sus consejos, apoyo y cariño brindados durante estos 23 años.

Gracias a los amigos, hermanos y compañeros de este largo viaje, a los que se han ido, a los que aún seguimos en el camino, con ustedes aprendí el verdadero significado de amistad. En especial gracias a: Detsy, Violeta, Azucena, Rosario, Rebeca, Alyn, Laura, Ariana, y a todas aquellas personas que me han brindado su amistad.

A los integrantes del comité revisor, Dra. Laura Patricia Ramírez Contiño, Dra. Guadalupe Aguilar Uscanga y al Dr. Julián Peña Castro por sus observaciones y comentarios hechos para el presente trabajo.

A mis profesores que durante toda la carrera me brindaron sus conocimientos, apoyo en las dudas sobre el presente trabajo, consejos y respeto brindados, en especial a: Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Andrés Aguirre Cruz, Dr. Enrique Villalobos Amador y a la jefa de carrera la Dra. Ana Karín Navarro.

Al M.C. Juan José Montor Antonio y M.C Nohemi Gabriela Cortes, por su paciencia, apoyo y conocimientos brindados, ya que fueron los primeros en enseñarme parte del laboratorio y manejo de los equipos.

Al Dng. Enrique Raga Carvajal agradezco por su paciencia y confianza, por enseñarme a estandarizar la metodología de las TLC, para el presente trabajo.

A la M.C. Betsy Uñiquez Balderas, por permitirme formar parte de su trabajo en mi primera estancia, por enseñarme lo que significaban las cinéticas (meses de desvelos), por confiar en mí, por su amistad y por brindarme sus conocimientos.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACIONES	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I	18
1.1 Generalidades	18
1.1.1 Aplicaciones de las amilasas.....	18
1.1.2 Fuentes productoras de amilasas.....	19
1.1.3 Mercado global de las enzimas	21
1.1.4 Clasificación de las enzimas	22
1.1.5 Clasificación de las amilasas	23
1.1.6 Propiedades estructurales de las amilasas.....	25
1.1.7 Mecanismos de reacción	28
1.1.8 Propiedades bioquímicas de α -amilasas	30
1.1.9 AmiJ33, la amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	33
1.2 Generalidades del almidón	34
1.2.1 Uso y aplicaciones del almidón	34
1.2.2 Estructura del almidón	35
1.3. Modificaciones estructurales del almidón	38
1.3.1 Gelatinización	38
1.3.2 La retrogradación	39
CAPÍTULO II	40
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	40

2.2 HIPÓTESIS	40
2.3 OBJETIVOS.....	40
2.3.1 Objetivo general.....	40
2.3.2 Objetivos particulares	40
CAPÍTULO III	41
3.1 METODOLOGÍA.....	41
3.1.1 Almacenamiento y conservación de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M y producción de AmiJ33	41
3.1.2 Activación de <i>B. amyloliquefaciens</i>	41
3.1.3 Producción de AmiJ33.....	41
3.1.4 Precipitación de AmiJ33 con sulfato de amonio	41
3.1.5 Determinación de la actividad amilasa	42
3.1.6 Electroforesis de proteínas.....	42
3.1.7 Zimogramas	44
3.1.8 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de AmiJ33	45
3.1.9 Termoestabilidad y vida media de AmiJ33	46
3.1.10 Estabilidad en diferentes pHs	47
3.1.11 Determinación de parámetros cinéticos $V_{\max}$ y K_m	47
3.1.12 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando AmiJ33	47
3.1.13 Hidrólisis y recuperación del almidón residual usando AmiJ33	47
3.1.14 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando Licuamil 340.....	48
3.1.15 Hidrólisis y recuperación del almidón residual usando Licuamil 340.....	48
3.1.16 Cromatografía en capa fina (TLC).....	48

CAPÍTULO IV	50
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1.1 Curva de crecimiento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	50
4.1.2 Purificación de AmiJ33 por precipitación con sulfato de amonio	51
4.1.3 Actividad <i>in situ</i> de AmiJ33	53
4.1.4 Caracterización bioquímica y enzimática de AmiJ33.....	54
4.1.5 Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33.....	58
4.1.6 Hidrólisis enzimática del almidón comercial con AmiJ33 y sus productos de reacción	59
4.1.7 Hidrólisis enzimática del almidón comercial con la enzima comercial Licuamil 340	62
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	67
ANEXOS	75
ANEXO I. PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LAS α -AMILASAS	75
ANEXO II. SECUENCIA GENICA Y SECUENCIA AMINOACIDICA DE AmiJ33.....	76
ANEXO III.CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA Y BSA	78
ANEXO IV. CURVA DE LINEALIZACION PARA LA OBTENCIÓN DE PM.....	79
ANEXO V. TABLA DE ANOVA	80
ANEXO VI. HOJA TÉCNICA DE LA ENZIMA COMERCIAL LICUAMIL	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo al tipo de reacción.....	22
Tabla 2. Propiedades bioquímicas de amilasas fúngicas.	31
Tabla 3. Propiedades bioquímicas de amilasas microbianas.	32
Tabla 4. Componentes para la preparación de dos geles SDS-PAGE	43
Tabla 5. Rango de separación de proteínas en geles de poliacrilamida.....	43
Tabla 6. SDS-PAGE copolimerizado con almidón.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ingreso de mercado por productos, Novozyme, report 2014.....	21
Figura 2. Principales países productores de enzimas.	22
Figura 3. Sitio de hidrólisis de cuatro tipos de amilasa sobre una molécula de almidón.....	25
Figura 4. Estructura 3D de una α amilasa	26
Figura 5. Estructura 3D del dominio A de una amilasa, 1E3Z.....	26
Figura 6. Estructura 3D del dominio B de α -amilasa,1E3Z	27
Figura 7. Estructura 3D del dominio C de una amilasa, 1E3Z.....	27
Figura 8. Mecanismo de reacción que ocurre en el sitio catalítico de las glicosil hidrolasas. .	29
Figura 9. Representación de la estructura de AmiJ33r.....	34
Figura 10. Estructura de una molécula de almidón; amilopectina y amilosa.....	36
Figura 11. Conformación de la amilosa en forma helicoidal	37
Figura 12. Modelo de la amilopectina y la amilosa.....	38
Figura 13. Diagrama de la placa y Cámara cromatográfica.	49
Figura 14. Crecimiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M y cuantificación de azúcares reductores.....	50
Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la α -amilasa (AmiJ33) de <i>B. amyloliquefaciens</i>	52
Figura 16. Zimogramas de AmiJ33; A, PAGE-nativo.B, SDS-PAGE	54
Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de AmiJ33.....	55
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33.....	55

Figura 19. Estabilidad a pH sobre la actividad de AmiJ33	57
Figura 20. Termoestabilidad de AmiJ33.	57
Figura 21. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	59
Figura 22. Producción de azúcares reductores por medio de la hidrólisis del almidón comercial empleando la α -amilasa (AmiJ33) de <i>B. amyloliquefaciens</i>	60
Figura 23. Cromatografía en capa fina (TLC) de la hidrólisis del almidón comercial empleando AmiJ33.	61
Figura 24. Hidrólisis de almidón nativo con la enzima comercial Licuamil 340.	62
Figura 25. Cromatografía en capa fina (TLC) de la hidrólisis del almidón comercial empleando Licuamil 340	63
Figura 26. Comparativa de la hidrólisis del almidón nativo con AmiJ33 y la enzima comercial Licuamil 340.	64

LISTA DE ABREVIACIONES

AmiJ33	α -amilasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M
JJC33M	Cepa aislada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
K_m	Constante de Michaelis Menten
V_{max}	Velocidad máxima
DNS	Ácido 3',5'-dinitrosalicílico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio
TLC	Cromatografía en capa fina
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
CDs	Ciclodextrinas glucanotransferasas
GP	Grados de polimerización
pH	Potencial de hidrógeno
Rf	Relaciones de frentes
PM	Peso molecular
GP1	Glucosa
GP2	Maltosa
GP3	Maltotriosa
GP4	Maltotetrosa
GP5	Maltopentosa
GP6	Maltohexosa
GP7	Maltoheptosa
t_{1/2}	Vida media
K	Constante de desactivación

RESUMEN

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1-4 o α -1-6 de la molécula del almidón, produciendo generalmente como productos glucosa y maltosa. Estas amilasas tienen aplicaciones en distintas industrias: textil, alimentaria, limpieza, papelería y biocombustibles, por mencionar algunas. Las enzimas de mayor demanda industrial son aquellas provenientes de fuentes microbianas, principalmente del género *Bacillus*. La región del Papaloapan es una zona megadiversa, donde se produce caña de azúcar. En un trabajo previo, a partir de suelos cultivados con caña de azúcar, se aisló la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M. Ésta es una bacteria Gram positiva que produce una α -amilasa (AmiJ33), la cual fue caracterizada parcialmente. AmiJ33 es una enzima no dependiente de Ca^{+2} , estable a 40°C y mantiene el 70 % de actividad a pHs ácidos. De acuerdo con las características analizadas podría ser apta para el sector de panificación. En el presente trabajo se realizó una caracterización más detallada de AmiJ33. AmiJ33 hidroliza tanto almidón nativo como almidón gelatinizado. Se requirió una concentración (60 %) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitar AmiJ33. Con respecto al efecto de pH sobre la actividad, AmiJ33 presentó un pH óptimo a 5.0. En cuanto a la estabilidad de pH sobre la actividad, AmiJ33 mostró su mayor actividad a pH 5.0 y mostró ser menos estable a pH 4.0 y 9.0. Al evaluar la temperatura sobre la actividad, AmiJ33 mostró una temperatura óptima a 80°C, aunque a esta temperatura AmiJ33 no es estable. De igual manera se evaluó la termoestabilidad de AmiJ33, mostrando una vida media de 16.5 h, 2.31 h y 15 min a 40, 50 y 60°C, respectivamente. De la misma manera se determinaron los parámetros cinéticos K_m y $V_{\max}$ para AmiJ33 los cuales fueron 10.6 mg/mL y 41.0 U/mg, respectivamente. Los productos de hidrólisis del almidón comercial (Jalmek) empleando a AmiJ33 fueron glucosa, maltosa y maltopentosa, mientras que los productos de hidrólisis de la enzima comercial Licuamil fueron glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa. A partir de estos resultados, es posible proponer a AmiJ33 para su uso en industrias de panificación, textil y alimentaria.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that catalyze the hydrolysis of α -1-4 or α -1-6 glucosidic bonds of the starch, produces glucose and maltose, has applications in several industries: textile, food, cleaning, paper and biofuels, among others. The principal producers of amylase are microorganisms, mainly *Bacillus* genus. Papaloapan region is a megadiverse area, where several tropical crops such as sugar cane are produced. In a previous work, *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M was isolated from soils cultivated with sugar cane. *Bacillus amyloliquefaciens* is a Gram positive bacterium, that produces an α -amylase, AmiJ33. AmiJ33 was partially characterized, is not a metalloenzyme, is stable at 40 °C and maintained 70 % of its activity at acidic pHs. According to the analyzed characteristics, AmiJ33 may be suitable for baking sector enzyme. In this work, a more detailed characterization of AmiJ33 was done. AmiJ33 was precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60 % and hydrolyzes both native starch and gelatinized starch. With respect to the effect of pH on the activity, AmiJ33 presented optimum pH at 5.0. As for the stability of pH on the activity, AmiJ33 showed most activity at pH 5.0 and was less stable at pH 4.0 and 9.0. To evaluate the effect of the temperature on the activity, AmiJ33 showed an optimum temperature at 80°C, although this temperature AmiJ33 is not stable. Also, thermo stability of AmiJ33 was evaluated, showing a half-life of 16.5 h, 2.31 h 15 min at 40, 50 and 60°C, respectively. Similarly, kinetic parameters K_m and V_{max} were evaluated on native starch, which were 10.6 mg/mL and 41.0 U/mg, respectively. Hydrolysis products of commercial starch (Jalmek) employing AmiJ33 were glucose, maltose and maltopentose, while hydrolysis products of commercial Licuamil enzyme were glucose, maltose, maltotriose and maltotetraose. From these results, it is possible to propose to AmiJ33 for use in industries baking, textile and food.

INTRODUCCIÓN

Las amilasas son enzimas que hidrolizan únicamente los enlaces glucosídicos α -1-4 del almidón o glucógeno, es decir los enlaces glucosídicos α -1-6 de la cadena ramificada de la amilopectina, no son atacados, por lo tanto puede producir glucosa, maltosa, maltotriosa y sobre todo α -dextrinas inicialmente (Walker y Whelan, 1960).

Estas enzimas son de gran importancia industrial, tienen aplicación en la industria alimentaria, de fermentación, la industria textil y papelera. Las amilasas se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo plantas, animales, y microorganismos, donde las enzimas microbianas generalmente satisfacen las demandas industriales. Hoy en día un gran número de amilasas microbianas están disponibles comercialmente y han sustituido casi por completo la hidrólisis química de la industria de procesamiento de almidón (Bedon *et al.*, 2013).

Los principales microorganismos productores de amilasas son *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *Aspergillus sp.* (Pandey *et al.*, 2000).

B. amyloliquefaciens es un bacilo Gram positivo, fermenta glucosa, manitol y produce una enzima α -amilasa (AmiJ33), que se caracterizó parcialmente en un trabajo previo titulado “Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *B. amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan”. Se concluyó que el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática fue óptimo a pH 6 y 80°C, empleando como sustrato almidón insoluble. A pHs ácidos (4.0 y 5.0), mantuvo el 72 % de su actividad y fue estable a 40°C por 3 h (Montor *et al.*, 2014).

Con la finalidad de obtener información sobre las características de AmiJ33 y su posible aplicación en algún sector industrial, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización cinética y bioquímica de AmiJ33 de igual manera se evaluó la capacidad de hidrólisis de AmiJ33 en comparación con la enzima comercial Licuamil 340 sobre almidón comercial (Jalmek). En donde se incluye el efecto de pH y temperatura sobre la actividad de AmiJ33, la termoestabilidad y los parámetros cinéticos K_m , V_{max} , y los productos de hidrólisis.

En el primer capítulo se describe la importancia de las amilasas a nivel industrial, las principales fuentes productoras, las clasificaciones, la estructura molecular y el mecanismo de acción de las amilasas. De igual forma se hace un resumen de las principales propiedades bioquímicas de las amilasas. Por otra parte también se describe la importancia a nivel industrial del almidón y sus estructuras. Finalmente se hace una breve reseña de las principales herramientas para el análisis estructural del almidón. En la segunda parte de la tesis se describe la justificación, hipótesis y objetivos del presente trabajo. Finalmente se puntualizan los materiales y métodos empleados, en el cuarto capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos.

CAPÍTULO I

1.1 Generalidades

1.1.1 Aplicaciones de las amilasas

Las amilasas son enzimas utilizadas en la industria alimentaria, de fermentación, papelera, cervecera y textil, para fabricar diversos productos o mejorar las características organolépticas del producto (Pandey *et al.*, 2000).

La principal aplicación de la α -amilasa en la industria es para la fabricación de cerveza (Carrera, 2003). El principal inconveniente para la producción de etanol a partir de almidón es que las levaduras no producen amilasas por tal motivo no fermentan el almidón y se necesita llevar a cabo una sacarificación previa. Para llevar a cabo la sacarificación se pueden realizar por medio de dos métodos: el químico y el enzimático (chica, 1996).

Otro proceso industrial en el que participan las amilasas es en la obtención de jarabes fructosados a partir de almidón, el cual es muy empleado para ser utilizado como edulcorante. En este proceso intervienen tres enzimas: la α -amilasa, que hidroliza el almidón en fragmentos cortos o unidades de maltosa, la glucoamilasa, que rompe las cadenas cortas procedentes de la acción de la α -amilasa, para formar unidades de glucosa; y la glucosa isomerasa, que convierte la glucosa en su esteroisómero fructosa (Hernández-Uribe *et al.*, 2008).

Otra aplicación de las amilasas se lleva a cabo en la industria de los detergentes donde se utilizan como aditivos para degradar los residuos de almidón de alimentos. Las amilasas no son componentes esenciales de los detergentes porque tienen una acción limitada sobre los carbohidratos, aunque la amilasa de *B. licheniformis* es comúnmente agregada en los jabones en polvo. Esta enzima es resistente a la degradación de las proteasas, es activa a temperaturas de 85°C y puede tolerar valores de pH cercanos a 10, sin embargo el principal problema de las amilasas en la formulación de detergentes es la oxidación (Kir *et al.*, 2002).

Las amilasas en la industria textil, se utilizan principalmente en el proceso del desengomado. El desengomado convencional puede ser realizado por hidrólisis ácida, álcalis o agentes oxidantes. También se puede desengomar por la descomposición del almidón mediante una fermentación en agua con microorganismos presentes en forma natural, que descomponen el

almidón del tejido. Actualmente, estos tratamientos ya no son usados debido a las dificultades propias del método, dejando lugar al uso de las amilasas. Para ello se utilizan las amilasas bacterianas provenientes de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, que son estables a altas temperaturas (Hendriksen *et al.*, 1999).

Las amilasas en la industria de panificación son muy utilizadas. Estas enzimas se pueden añadir a la masa de pan para degradar el almidón de la harina y obtener principalmente productos como dextrinas, estos productos son posteriormente fermentados por la levadura. La adición de la enzima amilasa a la masa da como resultados una mejora en la tasa de fermentación y la reducción de la viscosidad de esta misma, lo que da como resultados una mejora en el volumen y la textura del producto. Por otra parte, genera la producción de azúcar en la masa, lo que mejora el sabor, color de la corteza y el tostado, los cuales son las cualidades del pan. Además de generar compuestos fermentables, las amilasas también tienen un efecto anti-estancamiento en la cocción de pan, y mejora la retención de suavidad de los productos horneados, aumentando la vida útil de estos productos (van der Maarel, *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003). Actualmente, una amilasa maltogénica termoestable de *B. stearothermophilus* se usa comercialmente en la industria de panadería (van der Maarel, *et al.*, 2002).

1.1.2 Fuentes productoras de amilasas

Las amilasas pueden ser sintetizadas por diversas fuentes incluyendo plantas, animales, hongos, bacterias (Da Lagea *et al.*, 2007). Las enzimas de fuentes microbianas son generalmente utilizadas para procesos industriales ya que tienen una serie de ventajas como: productividad, termoestabilidad y bajo costo de producción. Las amilasas producidas por *B. subtilis* sp. *B. amyloliquefaciens*, *Escherichia spp.* *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurosporas*, *Penicillium*, *Rizhopus*, *Mucor* y *Candida* son las más comercializadas debido a sus características bioquímicas y cinéticas (Gupta *et al.*, 2003).

Fuentes microbianas

Las amilasas fúngicas y bacterianas son las fuentes principales de producción industrial de enzimas, debido a que presentan ventajas tales como: rentabilidad, consistencia de producto, menor tiempo de producción, manipulación segura, facilidad de modificación de procesos y optimización (Mamo *et al.*, 1999; Burhan *et al.*, 2003).

Entre las bacterias, el género *Bacillus sp.* es muy utilizado para la producción de α -amilasas principalmente: *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* que presentan distintas características deseables como: termoestabilidad, estabilidad a solventes, amplios rangos de operación de pH y temperatura, etc., dando lugar a amilasas con diversas aplicaciones (Kim *et al.*, 1995).

Fuentes fúngicas

Los organismos más utilizados para la producción de amilasas son los hongos filamentosos pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Falcifarum* ya que tienen la capacidad de crecer con mayor rapidez, excretan un gran número de enzimas y en cuanto a su biomasa en forma de micelio se facilita su separación de los medios de cultivo. En la producción industrial de enzimas cabe destacar a *Aspergillus oryzae* como productor de α -amilasas para su amplio uso principalmente en la industria de panificación. *A. oryzae* fue aislado sobre el arroz (*Oriza sativa*). En China, Japón y Corea del Sur utilizan el cultivo de estos hongos sobre el arroz cocido al vapor como base para preparaciones de la cocina asiática. Una de las principales aplicaciones es la transformación del arroz cocido en azúcares fermentables, para finalmente obtener vinagre de arroz, dulces como el amazake (dulce japonés a base de arroz) (Hesseltine y Wang, 1979).

En cuanto a la producción recombinante de amilasas en hongos, *A. oryzae* es el principal anfitrión de amilasas recombinantes debido a su capacidad para secretar una gran cantidad de proteínas. Sin embargo, la tendencia de producción de amilasas a nivel internacional, incluida la producción recombinante, cae sobre las especies del género *Bacillus* debido a que es un modelo atractivo no solo para la clonación, sino también para la expresión, debido a su alto nivel de secreción e inocuidad son considerados organismo generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (Gupta *et al.*, 2003).

1.1.3 Mercado global de las enzimas

La venta mundial de enzimas se ha incrementado de manera constante desde hace varios años y estudios de mercado concluyen que seguirán incrementando estas ventas en los próximos años. Por ejemplo las carbohidrasas fueron las enzimas con mayor mercado de productos con tan solo alrededor de 750 millones de dólares en el 2013 (Fig. 1). Se atribuye a que la creciente demanda de almidón en los alimentos y bebidas en la industria se incremente para impulsar el crecimiento de carbohidrasa en los próximos años. De igual manera se espera que las proteasas incrementen a una tasa compuesta anual del 7.9 % del 2014-2020, a causa de aumentar el consumo de proteína (Novozyme, report 2014). Muchas de las distribuidoras de enzimas esperan de los productos mencionados anteriormente para presenciar una gran demanda debido al amplio uso en aplicaciones que incluyen procesamiento de alimentos, la fabricación de queso, y la conversión del almidón en glucosa, clarificación de zumos de cerveza o frutas, o para el pretratamiento de la alimentación animal para mejorar la digestibilidad de la fibra (Gavrilescu *et al.*, 2005; Ghora *et al.*, 2009). En la actualidad la producción de enzimas a nivel mundial está a cargo de 18 compañías (Fig. 2) distribuidas en Europa, Asia y América, dominando casi el 75% de las ventas globales Novo Nordisk (Dinamarca) y DuPont (USA) con sus filiales Danisco-Genencor (USA), las compañías alemanas BASF y Henkel, la holandesa DSM, así como las japonesas Amano y Ajinomoto (del Moral *et al.*, 2015). En el 2014 se calculó que el mercado global de las enzimas era alrededor de 1,814 millones de dolares (Novozyme Report, 2014). Por lo tanto es un mercado que continuará creciendo.

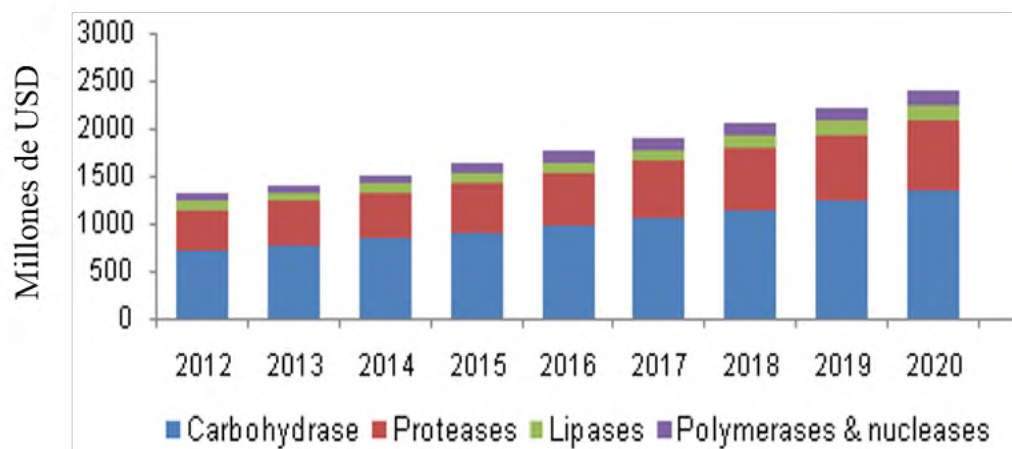


Figura 1. Ingreso de mercado por productos, Novozyme, report 2014.

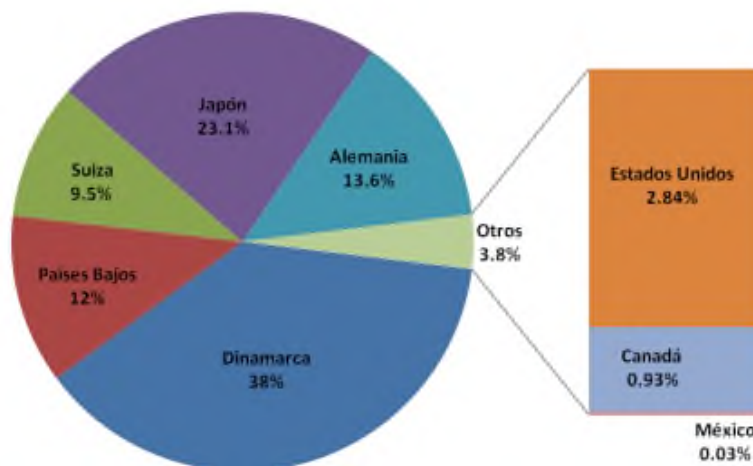


Figura 2. Principales países productores de enzimas. Con más del 75 % de venta de enzima lo ocupa Dinamarca, con una participación menor siguen Japón, Alemania y entre otros países, del Moral *et al.*, 2015.

1.1.4 Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican y se denominan de acuerdo con la naturaleza de la reacción química que catalizan. Existen seis clases principales de reacciones catalizadas por enzimas (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo al tipo de reacción

<i>Clasificación</i>	<i>Tipo de reacción catalizada</i>
<i>Oxidorreductasa</i>	Reacciones de óxido reducción
<i>Transferasa</i>	Transferencias de grupos funcionales
<i>Hidrolasas</i>	Reacciones de hidrólisis
<i>Liasas</i>	Eliminación de grupos para formar enlaces dobles
<i>Isomerasas</i>	Isomerización
<i>Ligasas</i>	Formación de enlaces acoplados con hidrólisis de ATP

Cada clase se subdivide a su vez en subgrupos con el propósito de especificar en forma específica el tipo de enlace formado, destruido o transformado, o los grupos transferidos, o las sustancias dadoras y aceptores de grupos o de electrones, y las sustancias realmente implicadas.

1.1.5 Clasificación de las amilasas

La comisión de enzimas (EC), clasifica a todas las enzimas al igual que a las amilasas mediante un código de cuatro números (EC X.Y.Z.W) en donde:

- ❖ X: Clase a la cual pertenece la enzima
- ❖ Y: Indica la subclase a la cual pertenece la enzima
- ❖ Z: Indica la subsubclase a la cual pertenece la enzima
- ❖ W: Identificación precisa sobre las cuales actúa la enzima, por lo general indica el orden en que cada enzima se va agregando a la lista.

Con base en las clasificaciones anteriores, las amilasas se pueden dividir en cinco grupos: α -amilasa, β -amilasa, amiloglucosidasa, ciclodextrinas y pululanasa.

Las α -amilasas (3.2.1.1) (Fig. 3) son producidas por animales, vegetales y microorganismos, los principales microorganismos productores de esta enzima son: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Aspergillus sp*, *B. coagulans*, *Lactobacillus amylophilus*, *Bacillus ssp*. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1-4 de la molécula del almidón, son generalmente estables a pH 5.5-8.0 en presencia de calcio, la actividad óptima de las amilasas normalmente ocurre entre pH 1.0 a 11.5 (Pandey *et al.*, 2000). La temperatura óptima de la actividad amilasa está asociada al crecimiento del microorganismo (Vihinen *et al.*, 1989).

La β -amilasa (EC 3.2.1.2) α -1,4-D-glucan maltohidrolasa (Fig. 3), está presente ampliamente en plantas y microorganismos tales como bacterias y levaduras, esta enzima actúa sobre los extremos no reductores de la amilosa, amilopectina o glicógeno; hidrolizando enlaces glicosídicos α -1-4, produciendo las formas β -anómicas de maltosa. La producción de las formas β -anómicas de maltosa se da por la inversión de la configuración α a β alrededor de la configuración del C1. Este cambio de configuración es el motivo por la que a esta enzima se le llama β (Reed, 1975; Henrissat, 1991; Georg-Kramer *et al.*, 2001).

La amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3) (Fig. 3) hidroliza los enlaces α -1-4 de los polisacáridos residuales que fueron expuestos a la acción de α y β amilasa. El principal producto de reacción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia claramente de la α y β amilasas. Las glucoamilasas son inactivas sobre almidón nativo. Su actividad máxima está entre pH 4 y 5.5 y temperatura alrededor de 55-65°C (Alan Wiseman, 1985).

La pululanasa (E.C. 3.2.1.41) (Fig. 3) también conocida como pululan-6-glucanohidrolasa, hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,6 en la molécula del pululano (polisacárido formado por unidades de maltotriosa) del almidón y tiene como productos principales la maltotriosa y maltosa e hidroliza el almidón para dar como producto principal maltosa (Adinarayana *et al.*, 2006). La pululanasa es usada como enzima complementaria para la hidrólisis de amilopectina junto con la α -amilasa. Existen dos tipos de pululanasa. Pululanasa de tipo I que únicamente hidroliza los enlaces α -1,6 del pululano y la pululanasa de tipo II que hidrolizan los enlaces α -1,6 en el pululano como también los enlaces α -1,4 de otros polisacáridos (Nakamura *et al.*, 1975).

Las ciclodextrinas glucanotransferasas (EC 2.4.1.19) (Fig. 3) son enzimas capaces de degradar el almidón convirtiéndolo principalmente en ciclodextrinas (CDs). Estas CDs son oligosacáridos cíclicos no reductores constituidos por 6 (α -CD), 7 (β -CD) u 8 (γ -CD) unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1-4, además de la ciclación estas enzimas catalizan otras tres reacciones: acoplamiento, transferencia e hidrólisis. En la actualidad las ciclodextrinas glucanotransferasas son estudiadas por su potencial uso biotecnológico, ya que debido a su estructura pueden formar complejos de inclusión con gran variedad de moléculas, debido a esta propiedad las CDs son utilizadas en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria, así como en procesos de bioconversión y separación (Tonkova, *et al.*, 1998).

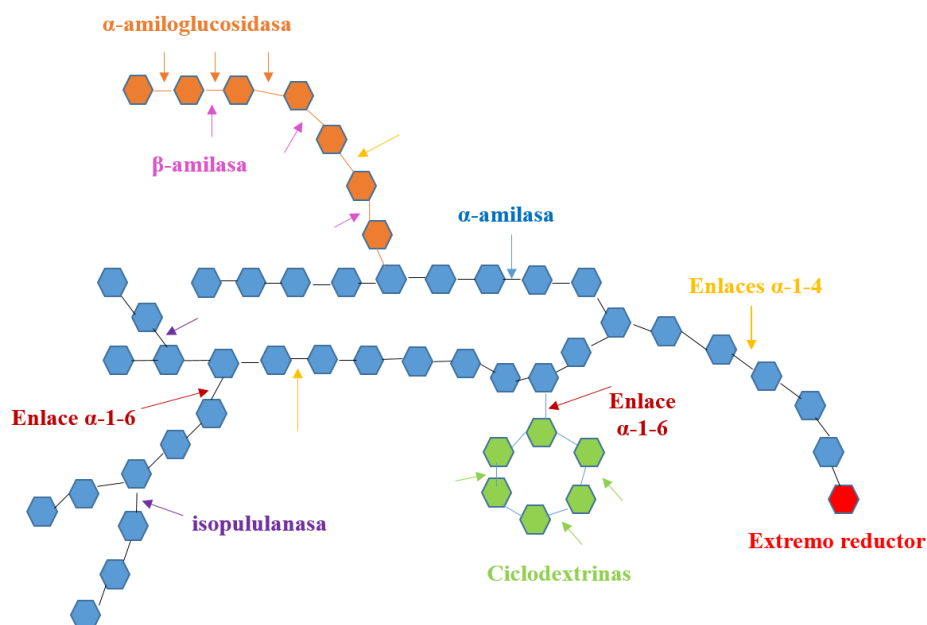


Figura 3. Sitio de hidrólisis de cuatro tipos de amilasa sobre una molécula de almidón. ● Acción de las amilasas sobre los enlaces α -1-4 glucosídicos, ● acción de las amiloglucosidasa, ● acción de la β -amilasa sobre los enlaces glucosídicos α -1-6, ● acción de las ciclodextrinas.

1.1.6 Propiedades estructurales de las amilasas

Estudios de rayos X de α -amilasas tanto de bacterias como de mamíferos han mostrado que todas las α -amilasas están conformadas por tres dominios llamados A, B y C (Fig. 4). El dominio A (Fig. 5) es el más conservado y se encuentra en todas las familias de las amilasas, es el núcleo de la molécula y consiste en un pliegue altamente simétrico de ocho estructuras secundarias denominadas β -láminas, estas estructuras se colocan en forma paralela como si estuvieran en un cilindro, se encuentran ocho estructuras secundarias llamadas α -hélices (TIM-barrel). El TIM-barrel contiene cuatro regiones conservadas que están relacionadas con el sitio activo presente en todas las amilasas (Kuruki *et al.*, 2005). La primera región abarca el extremo C-terminal de la lámina β_3 y residuo de histidina que interactúa con los residuos de glucosa del sustrato, la segunda región contiene una lámina β_4 con un residuo de ácido aspártico, que actúa como nucleófilo durante la catálisis, la tercera región contiene una lámina β_5 con un residuo de ácido glutámico que actúa como donador y aceptor de protones, la última región consiste en una lámina β_7 y un residuo de ácido aspártico y un residuo de histidina que pueden formar puentes de hidrógenos con residuos de glucosa del sustrato. En el dominio A se encuentra insertado el

dominio B (Fig. 6) este dominio está conformado por un largo bucle que sobresale entre la lámina β_3 y la α -hélice₃. El dominio C forma parte de la última secuencia en donde se localiza el extremo C-terminal, está conformado por una β -lámina unido al dominio A (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006) (Fig. 7). La mayoría de las amilasas contienen Ca^{2+} y/o Na^+ que contribuyen a aumentar su estabilidad estructural (Machius *et al.*, 1998) (Fig. 4).

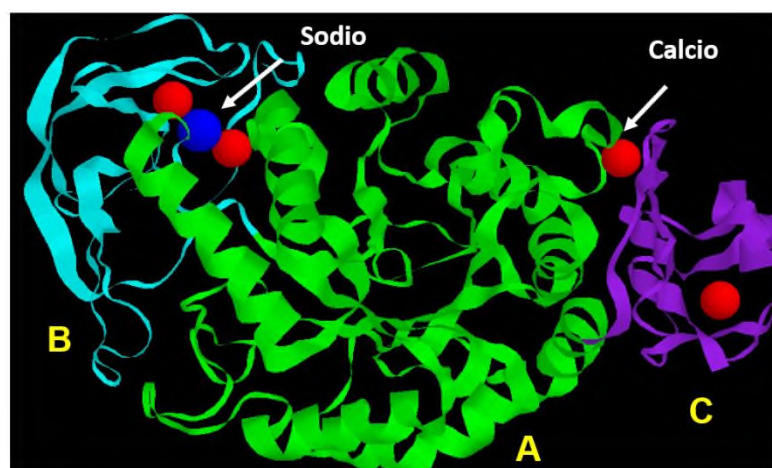


Figura 4. Estructura 3D de la α -amilasa de microorganismo (PDB: 1E3Z), vista la molécula en el programa Rasmol 2.6. ● Dominio B, ● dominio A, ● dominio C, ● iones de calcio, ● iones de sodio.

Dominio A

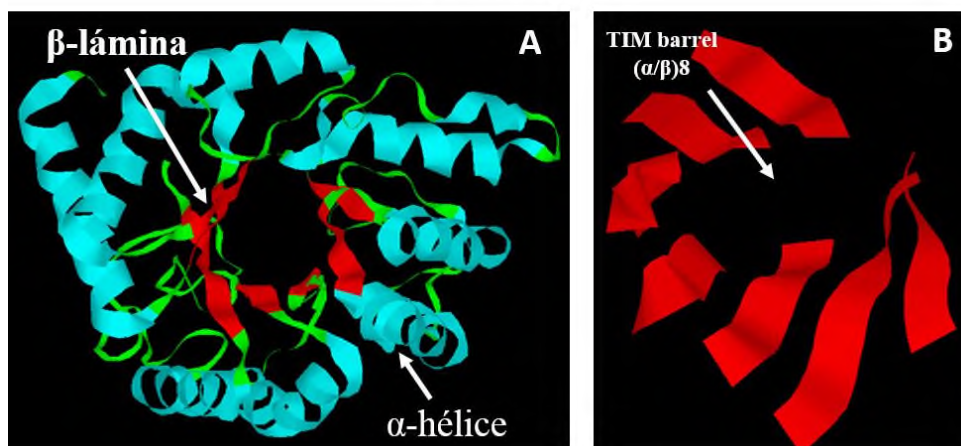


Figura 5. Estructura 3D del dominio A de la α -amilasa de microorganismo (PDB: 1E3Z), vista la molécula en el programa Rasmol 2.6. A). ● α -hélice, ● β -lámina. B). ● Estructura TIM barrel, conformada por β -láminas.

Dominio B

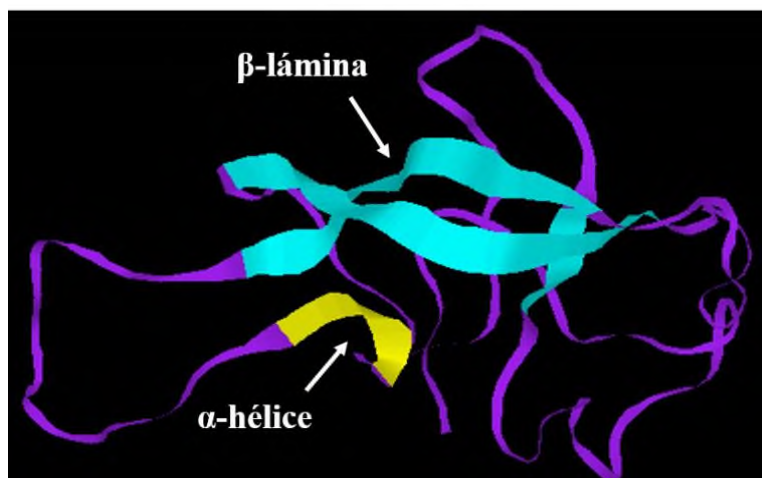


Figura 6. Estructura 3D del dominio B de la α -amilasa de microorganismo (PDB: 1E3Z), vista la molécula en el programa Rasmol 2.6. ● α - hélice, ● β -lamina.

Dominio C

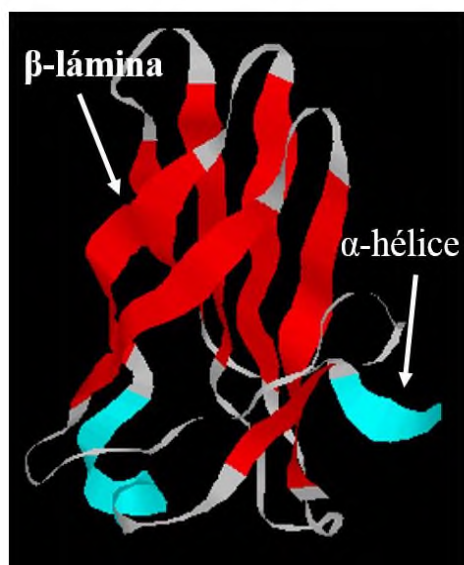


Figura 7. Estructura 3D del dominio C de la α -amilasa de microorganismo (PDB: 1E3Z), vista la molécula en el programa Rasmol 2.6. ● α - hélice, ● β -lamina.

1.1.7 Mecanismos de reacción

Las clasificaciones de las enzimas son de suma importancia ya que se ve reflejada una similitud de secuencias al momento de compararlas, lo cual da información estructural y evolutiva.

Henrisatt *et al.*, (1991) clasificaron a las enzimas con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos, la cual fue muy útil para la caracterización tridimensional de las enzimas incluida en cada familia. Se comprobó que dentro de una familia la estructura terciaria de las proteínas se conservaba, y como respuesta a esto se observó que la especificidad de la enzima por el sustrato viene determinada por ligeras modificaciones estructurales (Davis y Henrisatt, 1995).

Las glucosil hidrolasas son un grupo de enzimas que llevan a cabo la hidrólisis del enlace glucosídico, esta reacción está mediada por la acción de dos residuos catalíticos (uno actúa como donador de protones y otro como nucleófilo o base) presentes en el sitio activo.

El enlace glucosídico puede hidrolizarse de dos formas, esto depende de la configuración del carbono anomérico que haya resultado de la hidrólisis, si:

- ❖ La configuración del carbono anomérico cambia, se dice que la reacción que se lleva a cabo es por la inversión de la configuración.
- ❖ La configuración del carbono anomérico se mantiene, se dice que la reacción que se lleva a cabo es por retención de la configuración.

El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno (Fig. 8A). El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento (Fig. 8B). En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico. Como resultado tiene lugar la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glicósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glicosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua

que rompe el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Davies y Henrissat, 1995; Ly y Withers, 1999; Withers, 2000).

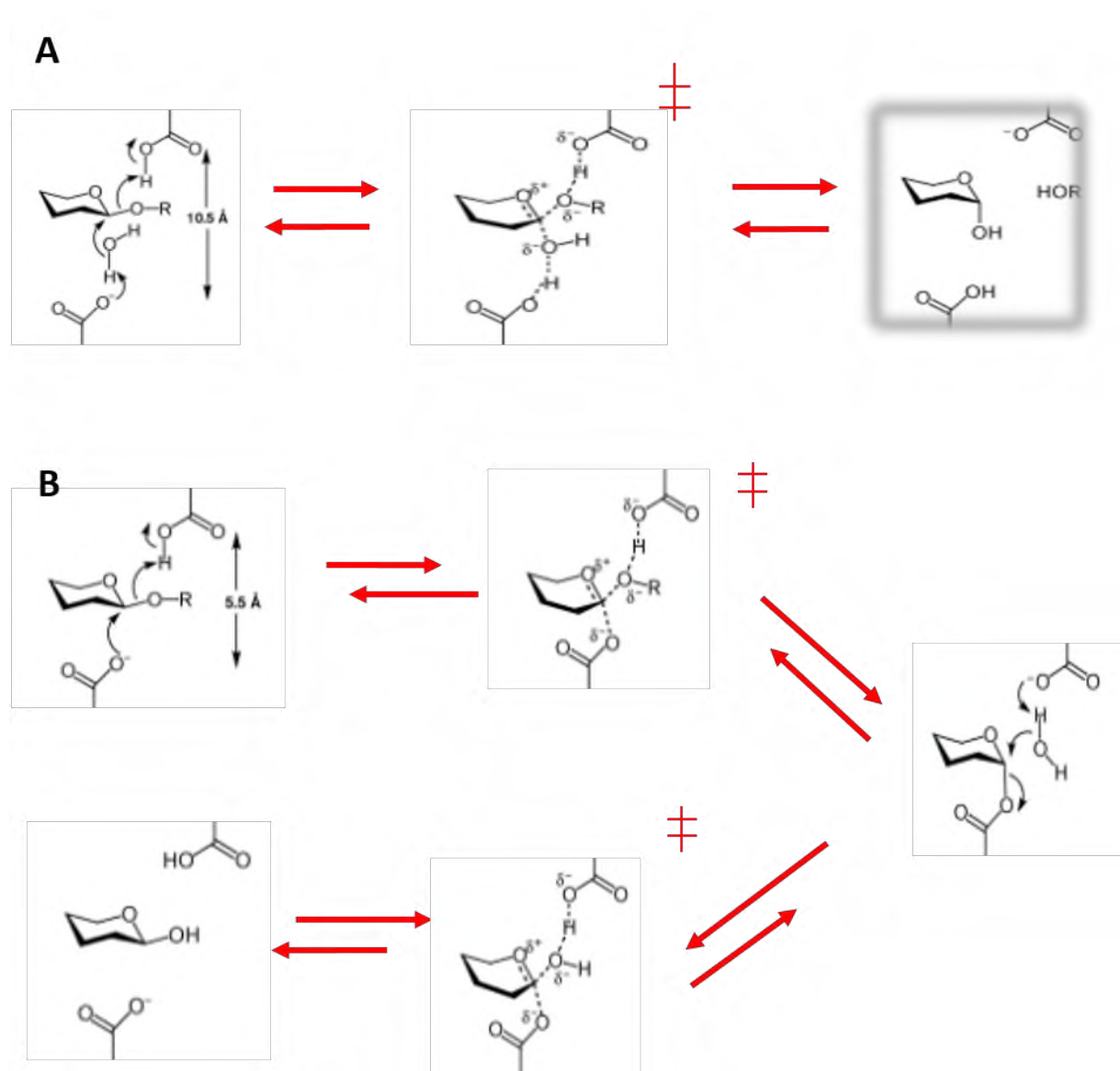


Figura 8. Mecanismo de reacción que ocurre en el sitio catalítico de las glicosil hidrolasas. A). Mecanismo de inversión. B). Mecanismo de retención, Rye y Withers, 2000.

1.1.8 Propiedades bioquímicas de α -amilasas

Las propiedades bioquímicas y enzimáticas de las amilasas de distintas fuentes son muy útiles para poder incorporar a las amilasas en algún sector industrial o para llevar acabo la producción de proteínas recombinantes en caso de que se necesite una mayor expresión o alguna característica deseada del gen que codifica para la enzima de interés. Como se muestra en la Tabla 2 y 3 la mayoría de las amilasas hidrolizan almidón soluble o también llamado almidón gelatinizado. El almidón gelatinizado se obtiene por el proceso de gelatinización, que se inicia cuando se calienta el almidón en presencia de agua aquí se produce incorporación de agua en el gránulo. Esto se produce primero en las áreas más amorfas y posteriormente en las áreas más cristalinas de la molécula del almidón. A medida que el calentamiento continúa, los gránulos del almidón captan más agua irreversiblemente y se hinchan, algunas cadenas cortas de amilosa salen de los gránulos y la estructura cristalina del almidón se pierde. Las soluciones del almidón soluble (gelatinizado) son opacas y frágiles. Por otro lado las amilasas no solo hidrolizan el almidón gelatinizado, hay algunas pocas amilasas que pueden hidrolizar el almidón nativo o también llamado almidón insoluble. El almidón en su estado nativo es insoluble en agua, forma una suspensión temporal de grandes partículas, que no se disuelven en el medio que las rodea y se depositan en el fondo de un recipiente con líquido al menos que se agite. Los gránulos del almidón pueden incorporar una mínima cantidad de agua, pero por lo general, la formación de la suspensión provoca un cambio mínimo en la estructura del almidón (Vaclavik, 2003), es por esta razón que a la mayoría de las amilasas le cuesta trabajo hidrolizar el almidón nativo.

Tabla 2. Propiedades bioquímicas de amilasas fúngicas.

Organismo	PM kDa	pH óptimo	Temperatura óptima	Parámetros cinéticos	Productos de hidrólisis	Tipo de almidón soluble/ insoluble	Referencias
<i>Hongos</i>							
<i>T. harzianum</i>	--	4.0	60°C	Km(3.5 mg/ml); Vmax (1.7 mg/min)	---	Almidón soluble	De Acevedo <i>et al.</i> ,2000
<i>A. oryzae</i> M13	52	5.4	50°C	Km (0.13 %)	---	Almidón soluble	Yabuki <i>et al.</i> ,1977
<i>T. viride</i>	---	5.0-5.5	Estable a 60°C(10 min)	----	---	No definido	Schellart <i>et al.</i> ,1976
<i>A. flavus</i> LINK	52.5	6.0	55°C	Km (0.5 g/L); Vmax (108.67µM/mg*min)	---	Almidón de yuca	Khoo <i>et al.</i> , 1994

Tabla 3. Propiedades bioquímicas de amilasas microbianas.

Organismo	PM (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima	Parámetros cinéticos	Productos de hidrólisis	Referencias	Tipo de almidón soluble/ insoluble
<i>Bacterias</i>							
<i>B. amyloliquefaciens</i>	58	5.0	50°C	Km (4.11 mg/ml); Vmax (3.07 mg)	Glucosa Maltosa	Almidón soluble	Gangadharan <i>et al.</i> ,2009
<i>B. amyloliquefaciens</i>	72	6.0	80°C	Km (3.23 mg/ml); Vmax (29.1U/mg)	----	Almidón soluble	Montor, 2015.
<i>B. subtilis</i> AX20	149	6.0	60°C	Km (3.3 mg/ml)	Glucosa Maltosa	Almidón soluble	Najafi <i>et al.</i> ,2005
<i>B. brevis</i> MTCC 7521	205	6.0	50°C	----	Glucosa Maltosa	Almidón soluble	Ray <i>et al.</i> ,2008
<i>B. stearothermophilus</i> ATTC 12980	59	5.0-6.0	70-80°C	Km (14 mg/ml)	----	----	Vihinen <i>et al.</i> ,1989
<i>B. sp</i> BKL20	---	7.0	60-70°C	---	----	No definido	Kubrak <i>et al.</i> ,2010
<i>B. subtilis</i> KIBGE HAS	56	7.5	50°C	Km (2.68 mg/ml)	----	No definido	Bano <i>et al.</i> , 2011
<i>B. licheniformis</i>	22.5	9.0	76°C	---	Maltopentosa	----	Saito,1973

1.1.9 AmiJ33, la amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

De los suelos de la cuenca del Papaloapan se aisló un microorganismo denominado *B. amyloliquefaciens* JJC33M, este microorganismo es un bacilo Gram positivo, fermenta glucosa y manitol, además produce una α -amilasa: AmiJ33 que tiene un peso molecular de 50 kDa. AmiJ33 fue caracterizada parcialmente, mostrando propiedades fisicoquímicas relevantes que podrían ser útiles en la industria. Por ejemplo, se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, concluyendo que los valores más altos de actividad se observaron a pH 6.0 y 80°C, respectivamente. Así mismo, en condiciones ligeramente ácidas (pH 4.0 y 5.0), AmiJ33 mantuvo el 72 % de su actividad y fue estable por 3 h a 40°C, y por 30 min a 45 y 50°C, conservando el 88 y 82 % de actividad residual, respectivamente. AmiJ33 mostró un incremento de su actividad de 50 % con β -mercaptoetanol, y no fue inhibida por ácido etildiaminotetraacético (EDTA) pero sí se inhibió totalmente con dodecilsulfato sódico (SDS). Con base en los datos parciales obtenidos, AmiJ33 podría tener un efecto potencial en la industria de panificación ya que presenta su máxima actividad entre los 50-80°C, desnaturalizándose a los 90°C (Montor *et al.*, 2014).

El genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M fue aislado y secuenciado incluido el gen completo que codifica para AmiJ33. A partir del oligonucleótido degenerado y de la secuencia del genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor y col., 2015) se identificó el gen de la α -amilasa (*amyJ33S*) desde el péptido señal hasta el codón de paro (ANEXO II).

El gen que codifica para AmiJ33 produce una proteína de 72 kDa, sin embargo, el microorganismo nativo produce una enzima funcional de 50 kDa. De acuerdo a estudios previos, AmiJ33 sufre procesamiento tanto en el N como en el C-terminal antes de ser exportada al medio extracelular, de ahí la diferencia del peso molecular de la enzima nativa y recombinante (Montor, 2015). La secuencia de *amyJ33S* traducida consiste en una secuencia de 659 aminoácidos y un peso molecular calculado de 72 kDa. El análisis de la secuencia aminoacídica revela que AmiJ33r tiene una alta identidad con α -amilasas del género *Bacillus* y que la estructura primaria está compuesta por un péptido señal, una región-P, un dominio A (317 aa), un dominio C (76 aa) y una región extra (176 aa) (Montor, 2015) (Fig. 9).

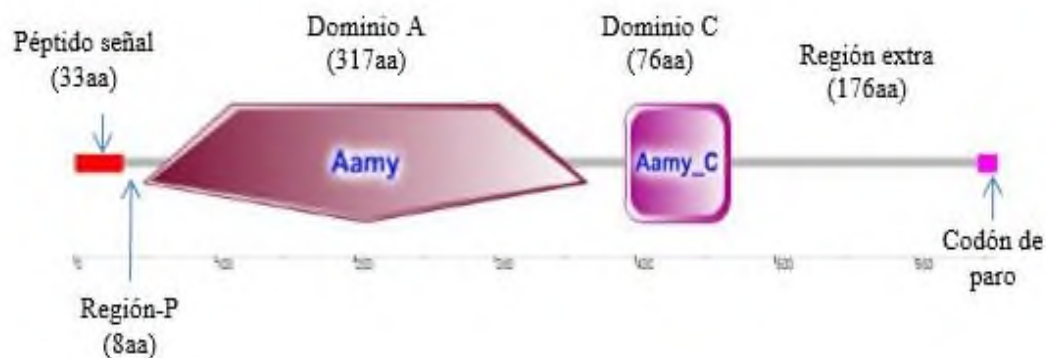


Figura 9. Representación de la estructura de AmiJ33r, Montor, 2015.

1.2 Generalidades del almidón

1.2.1 Uso y aplicaciones del almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en los productos agrícolas como: papa, plátano, yuca, entre otros. Desde el punto de vista nutricional, el almidón es el componente mayoritario en la dieta de las poblaciones humanas (Li *et al.*, 2004)

En la industria de los alimentos el almidón se utiliza como: agente espesante, encapsulante y para impartir sabor, además es utilizado en sopas enlatadas, postres, helados, carnes procesadas, salsas y productos horneados. El almidón de igual forma puede ser convertido en azúcares ya sea por procesos químicos, enzimáticos o físicos, para poder fabricar edulcorantes y jarabes. El uso de los almidones en las industrias no alimentarias es muy diverso como en la industria textil, papel, adhesivos y farmacéutica (Fuglie y Oates, 2001).

En la industria de papel, el almidón es un buen agente de encolado para el acabado de papel, mejorando la calidad y la viabilidad, además de ser un buen recubrimiento para el papel. El tamaño aumenta la rigidez y la resistencia en papel, es por tal motivo que se utilizan las enzimas α -amilasas para evitar los problemas mencionados anteriormente, estas enzimas lo que hacen es modificar el almidón que recubre al papel, como resultado se obtiene, la superficie del papel suficientemente suave y fuerte, para mejorar la calidad de redacción del documento (Bruinenberg *et al.*, 1996).

En la industria textil, el almidón se utiliza en tres procesos específicos: el tamaño, acabado e impresión. En el caso de los tejidos hechos de algodón o mezclas de algodón, fibras sintéticas, los hilos de urdimbre (longitudinal), están recubiertas con una sustancia adhesiva conocida como "tamaño". Esto es para evitar que los hilos se rompan durante el tejido. El tamaño más importante es almidón y derivados de almidón. Después de tejer, el tamaño debe ser retirado de nuevo con el fin de preparar la tela para el acabado (blanqueo, teñido e impresión). Este proceso (el desencolado) se puede llevar a cabo tratando el tejido con productos químicos fuertes tales como ácidos, bases o agentes oxidantes. Sin embargo, se han preferido las enzimas que hidrolizan el almidón (α -amilasa) durante muchos años debido a su alta eficiencia y la acción específica. Las amilasas logran la eliminación completa del tamaño, sin efectos nocivos sobre la tela (www.megazyme.com).

1.2.2 Estructura del almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas y es una fuente de energía para muchos organismos. Representa una fracción importante entre el 60-80 % en un gran número de productos agrícolas como: los cereales (maíz, trigo, arroz), leguminosas (frijoles, chícharos y habas), tubérculos (papa y yuca) (Bello y Paredes, 1999), por tal motivo el almidón es importante en todo el mundo. Las diferencias entre los tipos de almidones con respecto a la morfología del gránulo (tamaño, forma, presencia de poros, canales y cavidades), estructura molecular (amilosa y amilopectina) y composición (relación amilosa/ amilopectina, contenido de componentes no amiláceos), son las responsables de las variaciones en las propiedades funcionales del mismo (Huber y BeMiller, 2000; Ball *et al.*, 2011). Químicamente, el almidón está integrado por dos polímeros de glucosa de diferente estructura: la amilosa y la amilopectina, las cuales son las responsables de formar la estructura semicristalina de sus gránulos (Fig. 10).

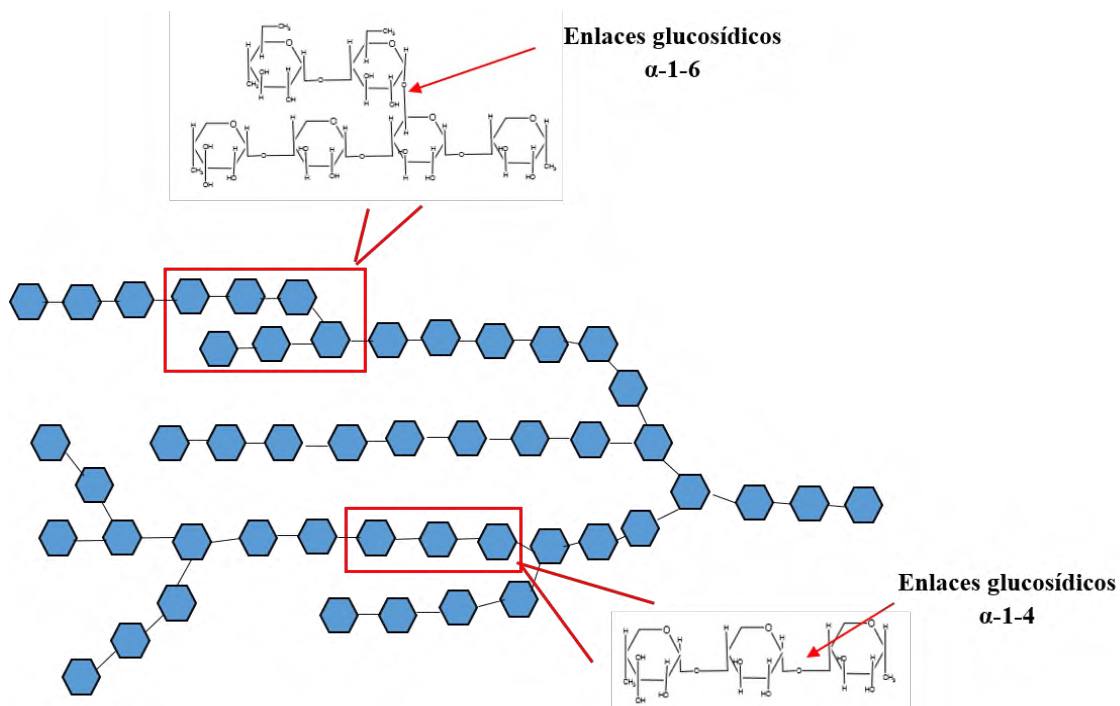


Figura 10. Estructura de una molécula de almidón; ● moléculas de glucosa; estructura de la amilopectina (enlaces glucosídicos α -1-6) y la estructura de la amilosa (enlaces glucosídicos α -1-4).

1.2.2.1 Características de la amilosa

La amilosa, es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1-4, en el cual algunos enlaces α -1-6 pueden estar presentes. La molécula de la amilosa no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal (Fig. 11) la cual presenta de 6-8 unidades de glucosa por cada vuelta. Por esta razón la amilosa y el yodo forman un complejo el cual es de color azul y es muy utilizado para cuantificar el contenido de amilosa en los almidones. La intensidad del color azul del complejo amilosa-yodo refleja información sobre la longitud de la cadena de amilosa (Knutzon y Grove, 1994).

La amilosa tiene una masa molar aproximadamente de 1×10^5 - 1×10^6 Dalton y está conformada alrededor de 500-6000 unidades de D-glucosa (MacAllister, 1979).

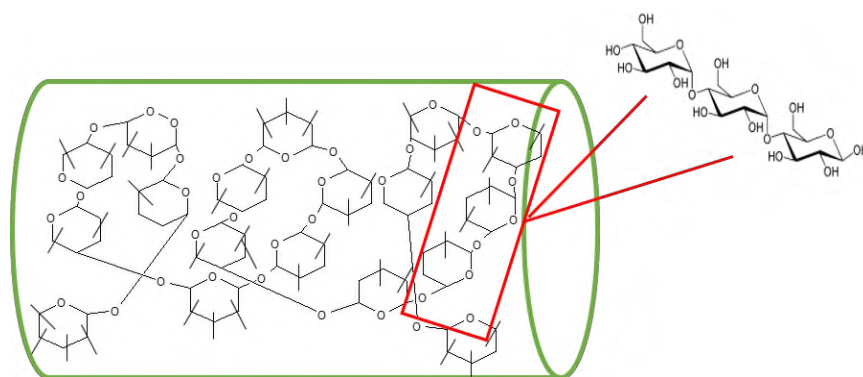


Figura 11. Conformación de la amilosa en forma helicoidal constituida por unidades de glucosa.

1.2.2.2 Características de la amilopectina

La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96 % por enlaces α -1-4 y en un 4-6 % con uniones α -1-6 en los puntos de ramificación. El peso molecular de la amilopectina es muy alto, con fracciones que llegan a alcanzar de 1×10^6 hasta 1×10^8 Dalton estas variaciones dependen de las fuentes botánicas del almidón (Bello Pérez *et al.*, 2002) aunque se han reportado pesos entre 300,000 y 500,000 Daltones. Algunos cereales como maíz, sorgo y el arroz tienen variedades “céreas” que están compuestos mayoritariamente por amilopectina (Badui, 2006).

La estructura de la amilopectina ha sido muy estudiada conforme se han ido desarrollando nuevas técnicas para su estudio, uno de los primeros modelos establecidos fue el de Meyer en 1985 llamado “Trichitic”, el cual poco más tarde no encajó con el comportamiento de la amilopectina. Meyer mencionaba en su modelo que las ramificaciones de la amilopectina eran muy frecuentes por lo cual el espacio se iba limitando conforme la amilopectina se elongaba hacia el exterior del granulo del almidón, poco más tarde y conforme se iban desarrollando las técnicas, el modelo de clúster fue nuevamente analizado pero esta vez por Hizukuri, quien utilizó técnicas más avanzadas como cromatografía de permeación en gel y desramificación, para finalmente llegar a la estructura que conocemos en la actualidad donde se describe a una cadena A, que presenta ramificaciones (Fig. 12A) y la cadena B que no las presenta (Fig. 12B) (Streb y Zeeman, 2011).

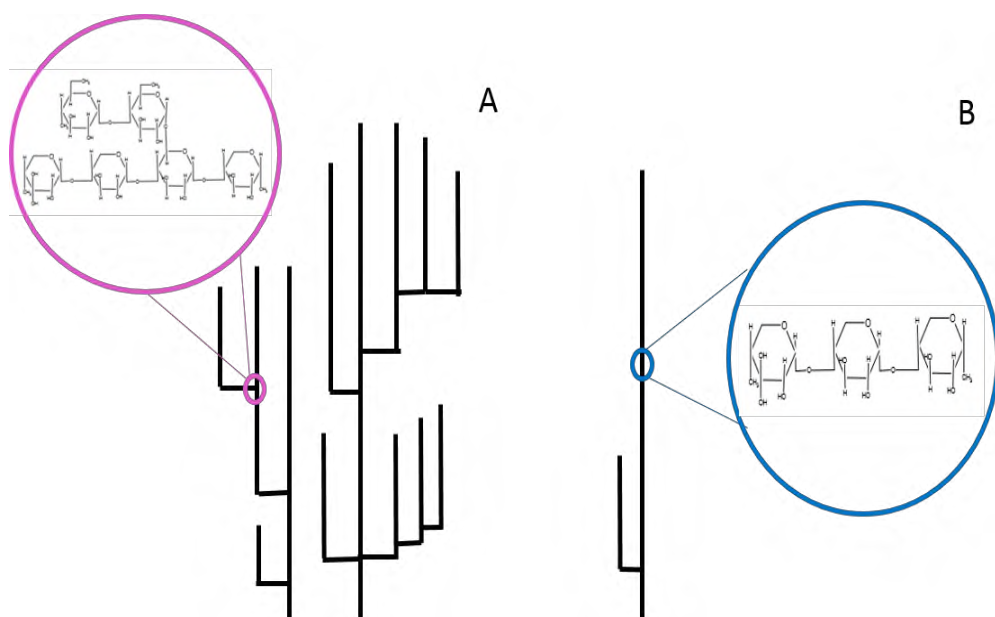


Figura 12. A) Modelo de la amilopectina; (B) Modelo amilosa. Streb y Zeeman, 2011.

1.3. Modificaciones estructurales del almidón

1.3.1 Gelatinización

Los gránulos del almidón son insolubles en agua a temperatura ambiente, debido a la estructura semicristalina representada principalmente por la amilopectina. Cuando el almidón se encuentra en una solución acuosa, los gránulos adsorben una pequeña cantidad de agua y sufren el proceso llamado hinchamiento, este proceso es irreversible (French, 1984). Cuando se calientan los gránulos de almidón con exceso de agua y sobrepasando la temperatura de gelatinización, los gránulos de almidón pierden la estructura cristalina nativa y por consecuencia pierden la estructura de la cruz de malta (birrefringencia), lo cual indica que el grado de organización cristalina de la amilopectina se pierde (Atwell, 1988).

El intervalo de temperatura para la gelatinización de los distintos almidones es específico para cada tipo, suele iniciar entre los 60 y 71°C y terminar entre los 88 y 95°C (Vaclavick, 2002).

A pesar de que las amilasas actúan en cualquier punto del almidón, no les es fácil hidrolizar el almidón insoluble, por lo contrario, hidrolizan mejor el almidón gelatinizado (soluble) debido a que la amilosa está más disponible (Vaclavick, 2002).

1.3.2 La retrogradación

La retrogradación se presenta cuando el almidón gelatinizado se enfría. En este proceso las moléculas de amilosa van a tener tiempo suficiente para alinearse de tal forma que con esta alineación pueden formar puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas adyacentes (Lineback y Rasper, 1988). La retrogradación del almidón ocurre en dos pasos: uno es la rápida gelificación de la amilosa por la formación de segmentos de dobles hélices y el otro es la lenta recristalización de cadenas cortas de amilopectina.

La velocidad de retrogradación depende de varios factores como: la longitud de las cadenas de la amilopectina, la concentración de lípidos y de los derivados monoéster y fosfatos (Srichuwong y Jane, 2007).

CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

Dada la demanda de amilasas, tan sólo en el año 2002, sus ventas en el mercado mundial se estimaron en \$600 millones de dólares en industrias como la alimentaria, farmacéutica, para la degradación y/o procesamiento del almidón, este trabajo propone caracterizar bioquímicamente la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, así mismo determinar los parámetros cinéticos $V_{\max}$, K_m , y los productos de hidrólisis del almidón comercial, con la finalidad de contar con una caracterización más completa y evaluar su potencial uso industrial.

2.2 HIPÓTESIS

AmiJ33 tiene características bioquímicas (es activa a pH 4-5 y tiene mayor actividad a temperaturas 60-80°C) y enzimáticas deseables para la industria alimentaria y generará productos de interés para esta industria a partir de la hidrólisis del almidón comercial.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Caracterizar bioquímica y enzimáticamente la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, AmiJ33 y analizar los productos derivados de su hidrólisis sobre almidón comercial.

2.3.2 Objetivos particulares

1. Producir y purificar a AmiJ33.
2. Desarrollar la metodología para observar a AmiJ33 por medio de zimograma.
3. Determinar la termoestabilidad, la vida media y la estabilidad a pH de AmiJ33.
4. Determinar los parámetros cinéticos K_m , $V_{\max}$ de AmiJ33 en almidón insoluble (Jalmek)
5. Determinar los productos de la hidrólisis del almidón comercial por medio de TLC utilizando a AmiJ33 y a la enzima comercial Licuamil 340.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Almacenamiento y conservación de *B. amyloliquefaciens* JJC33M y producción de AmiJ33

La cepa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se obtuvo de una colección de cepas aisladas de suelos cultivados con caña de azúcar (Montor *et al.*, 2014). *B. amyloliquefaciens* JJC33M se inoculó en caldo nutritivo a 37°C, 180 rpm, por 24 h, al término del tiempo establecido se conservó la cepa en glicerol al 80 % (700 µl de glicerol mas 500 µl de muestra) a -20°C.

3.1.2 Activación de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

La cepa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se tomó de la colección de las cepas aisladas de suelos cultivados con caña de azúcar y se sembró en cajas Petri con agar nutritivo y almidón 10 g/L, a 37°C por 24 h. Posteriormente se tomó una asada de *B. amyloliquefaciens* y se cultivó en caldo nutritivo con almidón 10 g/L, a 37 °C, 16 h, 180 rpm.

3.1.3 Producción de AmiJ33

Para producir AmiJ33, la fermentación se inoculó con 10 % (v/v) del inóculo en el medio compuesto por: extracto de levadura (5 g/L), K₂HPO₄(6 g/L), KH₂ PO₄ (3 g/L), CaCl₂ (0.1 g/L), citrato de sodio (0.5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (5 g/L), FeSO₄ (0.01 g/L), MnSO₄ (0.01 g/L), ZnSO₄ (0.001 g/L), enriquecido con almidón 10 g/L (Montor *et al.*,2014). La fermentación se incubó a 37°C, 180 rpm, y el sobrenadante se colectó al inicio de la fase estacionaria (aproximadamente entre 18-21 h). El sobrenadante de la fermentación se obtuvo por centrifugación (Heraeus Megafuge 16R Thermo Scientific) a 5580 g por 15 min y 4°C.

3.1.4 Precipitación de AmiJ33 con sulfato de amonio

La precipitación de AmiJ33 con (NH₄)₂SO₄ se realizó de acuerdo a Montor *et al.*, 2014, con ligeras modificaciones, donde se incrementó el tiempo de centrifugación de 10 a 40 min. El extracto crudo enzimático de Amij33 se saturó al 60 % con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ a 4°C. Después de la saturación, el extracto crudo enzimático se centrifugó a 5580 g por 40 min (Hereaus Megafuge 16R Thermo Scientific). Posteriormente, el precipitado obtenido de la saturación se resuspendió y se realizaron tres lavados con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH

7.0, 1 mM CaCl₂, utilizando filtros de 10,000 MWCO (MILLIPORE) y centrifugando a 5580 g por 40 min (Heraeus Megafure 16r Thermo Scientific). El extracto se concentró 100 veces.

3.1.5 Determinación de la actividad amilasa

La actividad amilasa se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 10 g/L de almidón en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, 1 mM CaCl₂ a 37 °C mediante la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácidodinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540nm de los azúcares reductores (Lambda 25 L600-00BB Perkin Elmer). Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática. (Miller, 1959). Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para generar un μ mol de azúcar reductor, equivalente a glucosa, por minuto.

3.1.6 Electroforesis de proteínas

La proteína se visualizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Se utilizó la cámara BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra System, con geles de 1 mm de espesor. El gel separador se preparó al 10 % y el gel concentrador al 4 % (las proteínas que se separan en esta concentración oscilan entre 50-200 kDa) (Tabla 4 y 5). La electroforesis se realizó a amperaje constante 25 mA por gel durante 1 h. Se utilizó como amortiguador de corrida una solución de Tris-base 30.3 g/L, glicina 144.2 g/L y SDS 10 g/L, como amortiguador de carga una solución de tris 1M pH 6.8, glicerol 1ml, SDS 0.2g, β -mercaptoetanol 0.5 ml y azul de bromofenol 0.5 % (p/v).

Tabla 4. Componentes para la preparación de dos geles SDS-PAGE

<i>Reactivo</i>	<i>Gel separador</i> <i>10 %</i>	<i>Gel concentrador</i> <i>4 %</i>
<i>Poliacrilamida</i>	3.3 mL	0.65 mL
<i>Amortiguador 0.5M Tris-HCl, pH 6.8</i>	---	1.25 mL
<i>Amortiguador 1.5M Tris-HCl, pH 8.8</i>	2.5 mL	----
<i>10 % p/v SDS</i>	0.1mL	50 µL
<i>Agua</i>	4.1 mL	3.05 mL
<i>TEMED</i>	5 µL	5 µL
<i>10 % p/v Persulfato de amonio</i>	50 µL	50 µL

Tabla 5. Intervalos de separación de proteínas en geles de poliacrilamida

<i>Intervalos de tamaños separables (kDa)</i>	<i>Concentración de acrilamida-bisacrilamida en el gel separador (%)</i>
36-205	5
34-205	7.5
14-205	10
14-66*	12.5
14-45*	15

3.1.6.1 Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Después de la electroforesis, el gel se incubó durante 10 min en una solución de ácido acético 10 % (v/v) y azul de coomassie 0.2 % (v/v). Posteriormente al gel se le realizaron 3 lavados para eliminar el exceso del colorante, con una solución de ácido acético 10 % (v/v) y metanol 30 % (v/v).

3.1.6.2 Determinación del peso molecular de la enzima α -amilasa

El peso molecular de la enzima se estimó comparándola con la distancia de migración de un patrón de proteínas de peso molecular conocido (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas).

Por tal motivo con los valores del marcador de peso molecular, se diseñó una curva de linealización para la obtención de PM, donde se graficaron los $\log(PM)$ versus la movilidad relativa (R_f) (Pérez, 2000). El R_f es la relación entre la distancia recorrida de la muestra (proteína de interés) y la longitud de corrida total del gel (ANEXO IV). Con estos valores se obtiene una ecuación lineal $\log(PM) = m(R_f) + b$, finalmente se sustituyeron los valores en la formula mencionada anteriormente. Se calculó el R_f de la proteína y se extrapolo en la curva el $\log(PM)$, aplicándole antilogaritmo, obteniendo el peso molecular de la proteína.

3.1.7 Zimogramas

El zimograma se realizó en SDS-PAGE desnaturalizante de acuerdo a Laemmli, 1970 y Martínez *et al.*, 2000 con ligeras modificaciones (Tabla 6). El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida sin adición de almidón, el gel separador se preparó al 10 % de acrilamida adicionado con almidón soluble 10 g/L (p/v) marca Jalmek. La migración se efectuó a 25 mA por gel, al término de la electroforesis el gel se incubó por 1 h a 4°C, 60 rpm (se utilizó el agitador de placas Labnet international Inc.) con una solución de 2.5 % (v/v) de tritón X-100 para remover el SDS y renaturalizar la enzima, posteriormente el gel se lavó con agua destilada para remover el exceso de tritón, después el gel fue incubado por 45 min a 4°C con una solución de 10 g/L de almidón para asegurar la penetración del almidón dentro de la matriz de acrilamida. Después de la incubación en frío, el mismo gel fue incubado (Excella E24 Incubator, New Brunswick Scientific) pero a 37°C por 1 h con amortiguador fosfatos pH 7.0 y fue revelado con solución de lugol (0.33 % p/v de I y 0.66 % p/v de KI). La actividad de la enzima se detectó por

la presencia de la hidrólisis del almidón que contenía el gel, observándose zonas claras en el mismo. Se utilizó la luz blanca del transiluminador (Benchtop UV transilluminator, UVP) para observar el halo de hidrólisis.

Tabla 6. SDS-PAGE copolimerizado con almidón.

<i>Reactivo</i>	<i>Gel concentrador 4 %</i>	<i>Gel separador 10 %</i>
Poliacrilamida	0.65 mL	3.3 mL
Amortiguador 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL	----
Amortiguador 1.5M Tris-HCl, pH 8.8	----	2.5 mL
Almidón soluble 1 % (p/v)	----	0.52 mL
Agua destilada	3.05 mL	4.1 mL
SDS 10 % (p/v)	50 µL	0.1 mL
TEMED	5 µL	5 µL
10 % p/v Persulfato de amonio	50 µL	50 µL

3.1.8 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de AmiJ33 de *B. amyloliquefaciens*

El efecto del pH sobre la actividad se realizó incubando la enzima por 1 h, 4 °C, con los amortiguadores correspondientes (amortiguador de acetatos para pH 4.0 y 5.0, amortiguador de fosfatos para pH 6.0, 7.0, 8.0 y amortiguador de glicina-NaOH para pH 9.0). Para realizar el experimento se incubó 0.12 U de enzima a los diferentes pHs de estudio (desde 4.0 hasta 9.0) a 4°C por 1 h, este paso fue necesario para que AmiJ33 se estabilizara al pH de estudio y así se pudiera evaluar el efecto del pH, al término de ese tiempo se adicionó almidón nativo 10 g/L (almidón comercial resuspendido en amortiguador a los diferentes pHs de estudio). La actividad enzimática se determinó por duplicado a 45°C, 1mM de CaCl₂, cuantificando azúcares reductores mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa, se midió la actividad a 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C a diferentes tiempos, pH 5.0 (pH óptimo) en amortiguador acetatos, incubando previamente el almidón 5 min a la temperatura evaluada. La actividad enzimática se determinó por duplicado a 45°C, 1mM de CaCl₂, cuantificando azúcares reductores mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

3.1.9 Termoestabilidad y vida media de AmiJ33

Para determinar la termoestabilidad de AmiJ33 se incubó por 1 h a distintas temperaturas de 40, 50 y 60 °C. Se tomaron alícuotas a diversos tiempos, a dichas muestras se determinó actividad residual a 45 °C usando como sustrato almidón 10 g/L a pH 5.0 (pH óptimo). La actividad enzimática residual se determinó mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) por duplicado a 45°C, 1mM de CaCl₂ (Miller, 1959). Con estos datos se calculó la vida media de la enzima ($t_{1/2}$) y la constante de desactivación de primer orden k . A partir de la siguiente expresión:

$$\ln A = -kt + \ln A_o$$

Se obtiene la siguiente ecuación

$$\ln \frac{A}{A_o} = -kt$$

Donde:

A_o = Actividad inicial

A = Actividad a determinado tiempo

Por tal motivo la ecuación para calcular la vida media queda de la siguiente manera:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

3.1.10 Estabilidad en diferentes pHs

La enzima AmiJ33 se incubó por 24 h, 4°C, a diferentes pH (amortiguador de acetatos para pH 4.0 y 5.0, amortiguador de fosfatos para pH 6.0, 7.0 y 8.0, amortiguador de Glicina-NaOH 50mM para pH 9.0). Al término de la incubación, se agregó 10 g/L de almidón nativo. La actividad enzimática residual se determinó mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) por duplicado a 45°C, 1mM de CaCl₂ (Miller, 1959).

3.1.11 Determinación de parámetros cinéticos V_{max} y K_m

Se evaluó el efecto del sustrato en la velocidad de reacción, para ello se emplearon diferentes concentraciones del almidón (1-14 mg/ml) y se determinó la actividad de AmiJ33. La determinación de la velocidad de reacción se realizó a pH 5.0 (pH óptimo), 45°C y 1mM de CaCl₂ mediante la medición de azúcares reductores por la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La velocidad máxima que puede alcanzar una enzima (V_{max}) y la afinidad de la enzima por el sustrato (K_M) se calcularon mediante la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis Menten con el software OriginLab9.0 (Versión 9.0).

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{(K_m + S)} \text{ ----- Ec. Michaelis Menten}$$

3.1.12 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando AmiJ33

Para la determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial por medio de AmiJ33, se incubó 0.12 U de enzima a 45°C a pH 5.0, posteriormente se adicionó como sustrato almidón nativo 10 g/L, se tomaron 100 µL de muestra a distintos tiempos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 min durante 3 h. Los productos de hidrólisis se observaron mediante cromatografía en capa fina (TLC). La actividad enzimática se determinó por duplicado independientes a 45°C, 1mM de CaCl₂, con la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

3.1.13 Hidrólisis y recuperación del almidón residual usando AmiJ33

Se incubó 0.12 U de enzima a 45°C a pH 5.0, posteriormente se adicionó como sustrato almidón nativo 10 g/L, se tomó muestra a distintos tiempos 0, 20, 40 y 60 min durante 1 h, posteriormente la reacción enzimática se desactivó calentando la muestra a 90°C por 5 min. El

almidón residual de cada alícuota se colectó por centrifugación a 10 000 g por 2 min (Hereaus pico 17 Thermo Scientific), donde el sobrenadante se desechó y el pellet se secó en una incubadora a 50°C por 24 h (New Brunswick Scientific, Excella E24) para su posterior análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB).

3.1.14 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando Licuamil 340

Para la determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial por medio de la enzima comercial Licuamil 340 (EMMEX), se incubó 44.2 U/mg de proteína (se utilizó la actividad específica debido a que en la ficha técnica solo marcaba las unidades de la enzima) a 70°C a pH 6.0, posteriormente se adicionó como sustrato almidón nativo 10 g/L, se tomó muestra a distintos tiempos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 min durante 3 h, posteriormente la reacción enzimática se desactivó calentando la muestra a 90°C por 10 min. Los productos de hidrólisis se observaron mediante cromatografía en capa fina (TLC). La actividad enzimática se determinó por duplicados independientes a 45°C, 1mM de CaCl₂, con la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

3.1.15 Hidrólisis y recuperación del almidón residual usando Licuamil 340

Se incubó 44.2 U/mg de enzima a 70°C a pH 6.0, posteriormente se adicionó como sustrato almidón nativo 10 g/L, se tomó muestra a distintos tiempos 0, 20, 40 y 60 min durante 1 h, posteriormente la reacción enzimática se desactivó calentando la muestra a 90°C por 10 min.. El almidón residual de cada alícuota se colectó por centrifugación a 10 000 g por 2 min (Hereaus pico 17 Thermo Scientific), donde el sobrenadante se desechó y el pellet se secó en una incubadora a 50°C por 24 h (New Brunswick Scientific, Excella E24) para su posterior análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB).

3.1.16 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas comerciales de sílica gel 60 GF₂₅₄, de 10 cm x 10 cm x 0.25 mm, Merck. Las placas se desarrollaron en el sistema de fase móvil: butanol/etanol/agua (30/50/20) v/v/v, mediante una técnica ascendente con desarrollo simple. Se colocó 1µl de cada muestra hidrolizada así como de los estándares de maltodextrinas, 2-7 grados de polimerización (GP),

las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por unos segundos, posteriormente, la placa se colocó en una cámara cromatográfica. La cromatografía se detuvo cuando la fase móvil recorrió 8.5 cm, para ello se retiró la placa de la cámara. Posteriormente, una vez que la placa se secó a temperatura ambiente, ésta se asperjó con una solución de α -naphtol (5 g de α -naphtol, 171.85 ml de etanol, 13.71 ml de agua y 22.28 ml de H_2SO_4) y se secó con aire caliente 70°C. (Fig. 13).

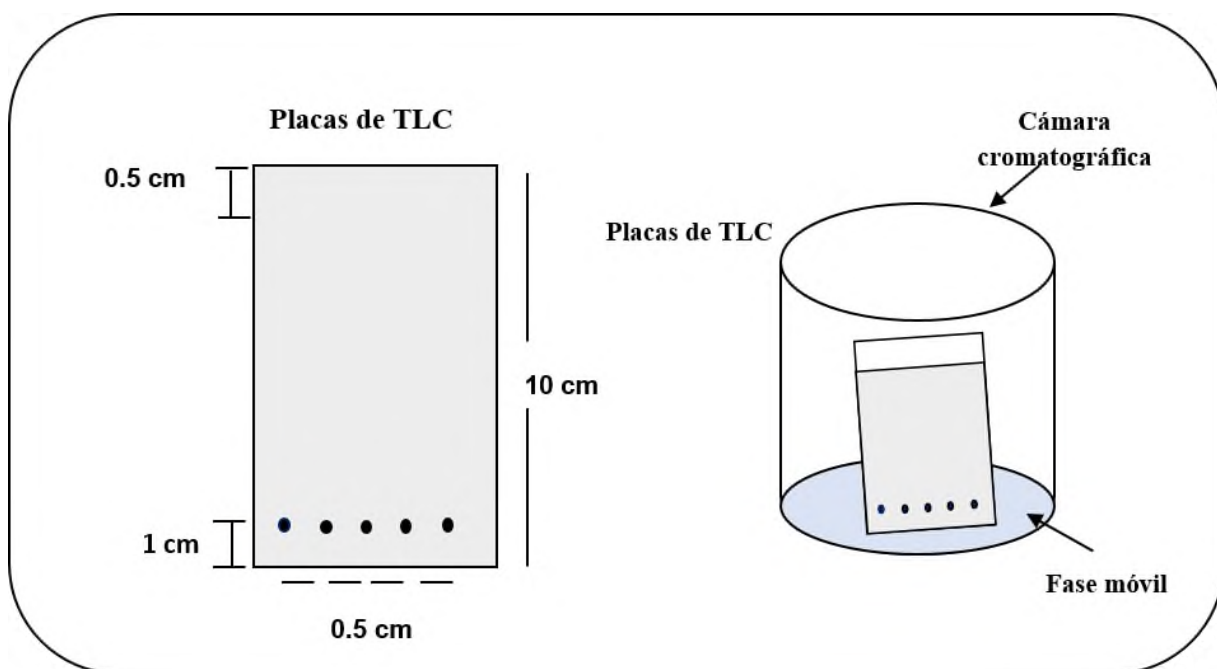


Figura 13. Diagrama de la placa y Cámara cromatográfica.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Curva de crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

La cinética de crecimiento (Fig. 14) se siguió con la cuantificación de la densidad óptica (DO_{600nm}) del cultivo y se determinó el tiempo de mayor producción enzimática por la acumulación de azúcares reductores. En trabajos reportados para α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (Montor et al., 2014) se concluye que la fuente de nitrógeno y la relación C: N es muy importante para la producción enzimática, es posible que cuando se agota la fuente de nitrógeno (la cual es el sustrato limitante) en el medio, el microorganismo se muere y por consecuencia disminuye la producción de la enzima.

El crecimiento se efectuó a 180 rpm y 37°C por 24 h. Varios autores reportan 37°C como la temperatura óptima de producción de las amilasas de *B. licheniformis* ATCC 12759 (Akcan, 2011), *B. cereus* (Vijayabaskar et al., 2012), *B. subtilis* AX20 (Najafi et al., 2005), *B. amyloliquefaciens* (Montor et al., 2014).

Durante la cinética de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, se observó la fase de crecimiento exponencial que fue a partir de las 0 h concluyendo a las 18 h, entre las 18-24 h se observó la fase estacionaria.

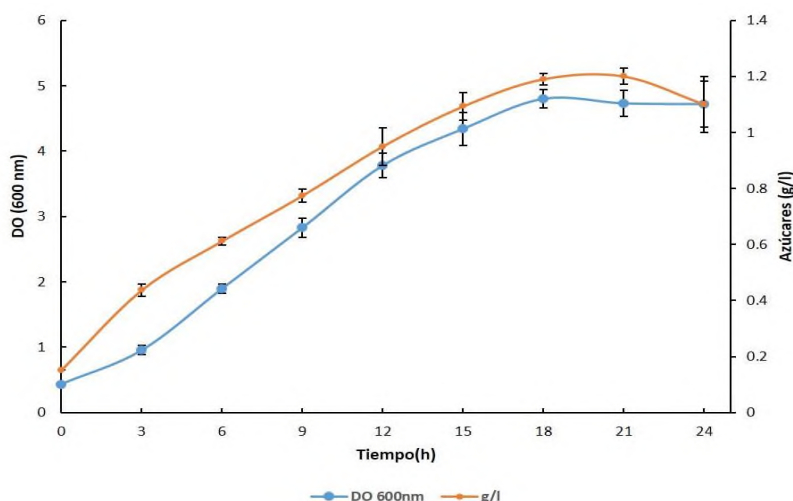


Figura 14. Crecimiento de *B. amyloliquefaciens* JJC33M ● DO_{600nm} y cuantificación de azúcares reductores presente en el medio ● g/L. Condiciones del experimento: 37°C, 180 rpm, 24 h. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

El aumento de la concentración de azúcares reductores en el medio (Fig. 14) se relaciona con el aumento de la actividad enzimática, esto se debe a que la enzima es necesaria para el crecimiento microbiano. La producción de azúcares reductores (y por lo tanto la expresión de AmiJ33) se inicia durante la fase exponencial, que abarca entre las 3-18 h, y alcanza su punto máximo durante la fase estacionaria (18 a 21 h). En diversos trabajos se ha reportado que la mayor producción de amilasas se alcanza durante la fase estacionaria, por ejemplo producción para *B. licheniformis* ATCC 12759 (Akcan, 2011) en un rango aproximado de 48-72 h, *B. sphaericus* (Al-Qodah *et al.*, 2007) produce la mayor cantidad de α -amilasa en un periodo entre 22-32 h, *Bacillus sp.* (Goyal *et al.*, 2005) produce la mayor cantidad de α -amilasa entre las 30-48 h. *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor *et al.*, 2014) produce la mayor cantidad de α -amilasa entre las 15-21 h, estos tiempos son similares a los reportados en este trabajo. La ventaja que tiene una máxima producción de enzimas en menor tiempo, es una característica deseada para poder mejorar el proceso, aislando los genes de interés y expresándolos en algún vector.

4.1.2 Purificación de AmiJ33 por precipitación con sulfato de amonio

AmiJ33 se precipitó del medio libre de células (extracto crudo) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) al 60 %. El precipitado se lavó tres veces con el amortiguador de fosfatos pH 7.0 con la finalidad de remover el exceso de sulfato de amonio y resuspender la enzima. La fracción proteica resultante de la precipitación se concentró 100 veces el volumen inicial del extracto crudo enzimático, mediante centrifugación a 5580 g. Diversos autores han reportado la recuperación de amilasas saturando con sulfato de amonio al 60 % (Sodhi *et al.*, 2005; Montor-Antonio *et al.*, 2014), otros autores reportan la recuperación de estas enzimas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) al 40 % (Quintero *et al.*, 2009), al 70 % (Park *et al.*, 2013) y 80 % (Gangadharan *et al.*, 2008; Demirkan, 2011). La concentración de sulfato de amonio utilizada, depende de la composición aminoacídica de la proteína, se ha visto que cuando se incrementa el contenido de aminoácidos alcalinos se requiere aumentar la concentración de sulfato de amonio para precipitar la proteína (Montor, 2015).

Al precipitado obtenido (60 %) se le realizó una electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante (Fig. 15). A partir del gel se estima que el peso molecular de AmiJ33 es de 50 kDa, el cual se obtuvo de acuerdo a la curva de linealización para la obtención del PM y a las Rf calculadas. El coeficiente de correlación para la regresión fue de 0.98 (ANEXO IV). En el mismo gel se observan otras bandas con peso molecular alrededor de 30-36 kDa, esto se debe a que no se obtuvo totalmente pura la enzima, posiblemente se trate de algunas otras proteínas producidas por *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Por otro lado no se puede hablar de posibles isoformas de la α -amilasa (AmiJ33) debido a que esas bandas no se observaron en el zimograma (Fig. 16B).

El peso molecular de las α -amilasas nativas varía de acuerdo al microorganismo productor ya que se observado en algunos reportes de *Bacillus* sp. AB68 que produce una amilasa de 66 kDa (Aygan *et al.*, 2006), *B. subtilis* produce una α -amilasa de 56 kDa (Demirkan, 2011), *Bacillus* sp. Produce una α -amilasa de 59 kDa (Sajedi *et al.*, 2005) y *B. amyloliquefaciens* produce una α -amilasa de 56 kDa (Gangadharan *et al.*, 2009) esto sucede cuando las muestras migran en condiciones desnaturalizantes.

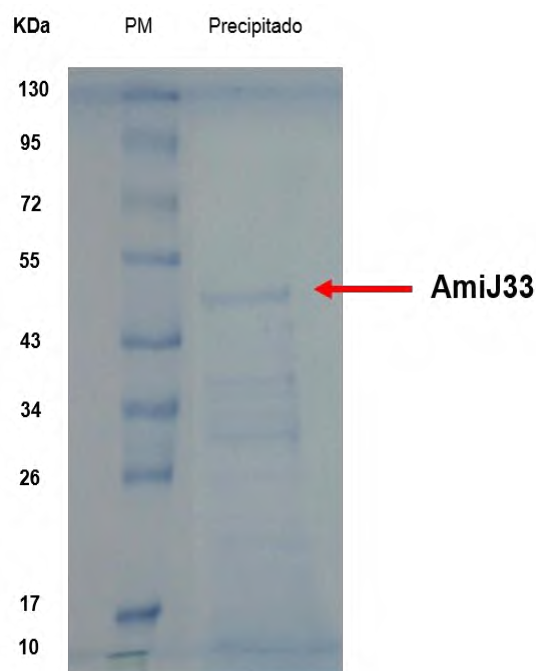


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens*. M, marcador de peso molecular; 1, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%.

4.1.3 Actividad *in situ* de AmiJ33

El zimograma de AmiJ33 se realizó en una electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante (gel concentrador 4 % acrilamida y gel separador 10 % acrilamida), el gel separador fue suplementado con almidón soluble 10 g/L marca Jalmek. Lo primero que se realizó fue una electroforesis en condiciones nativa sin SDS (nativa-PAGE), en este zimograma AmiJ33 solo mostró actividad en el gel concentrador, el color azul oscuro del gel se debe a que el gel fue copolimerizado con almidón y después de la electroforesis el mismo gel fue incubado con almidón, este paso se realizó para que el almidón se incorporara a la matriz de acrilamida en caso de que no se hubiera homogenizado totalmente (Fig. 16A), el resultado de la electroforesis en condiciones nativa, se piensa que se debe a que son enzimas de peso molecular grande por lo cual en forma nativa le cuesta trabajo eluir, se han obtenido trabajos similares con α -amilasas de *Bacillus sp.* BKL20 (Kubrak *et al.*, 2010) y *B. amyloliquefaciens* (Montor, 2015). Por otro lado se procedió hacer el zimograma SDS-PAGE desnaturalizante (Fig. 16B) en este zimograma se logró observar una banda clara, la cual indica que AmiJ33 mostró actividad, por tal motivo corresponde a la banda de 50 kDa del gel teñido con azul de Coomassie (Fig. 15). El color morado claro del gel se debe a que se le realizaron lavados al gel para poder eliminar el exceso de almidón y de la solución lugol y permitiera ver la banda. Cabe mencionar que el SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independiente de cada proteína, las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS proteína están cargados negativamente de forma uniforme (García, 2000).

La movilidad electroforética en una PAGE es función del tamaño y de la carga por unidad de masa; como ésta es constante para todos los complejos SDS-proteína, esta movilidad es solamente función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa (www.cultek.com). Es por esta razón que se piensa que AmiJ33 logró eluir en el zimograma SDS-PAGE desnaturalizante.

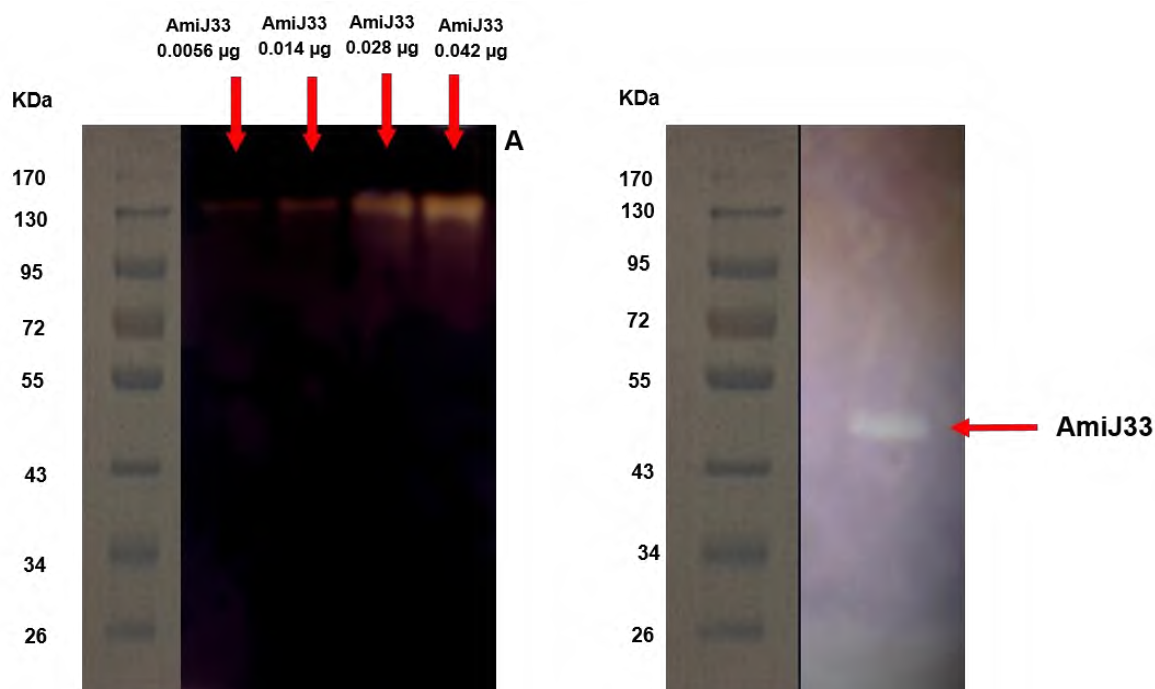


Figura 16. Zimogramas de AmiJ33; A, PAGE-nativo suplementado con almidón soluble al 1 % (p/v); B, SDS-PAGE suplementado con almidón soluble al 1 % (p/v).

4.1.4 Caracterización bioquímica y enzimática de AmiJ33

4.1.4.1 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de AmiJ33

El efecto del pH sobre la actividad de AmiJ33 se determinó en un intervalo de pH de 4.0 a 9.0, a 45°C. A un pH de 5.0 se observó la mayor actividad de AmiJ33 (Fig. 17). A pH 4.0 AmiJ33 mostró el 94 % de la actividad, a pH 6.0 la enzima mostró el 77 % de actividad, disminuyendo su actividad a pH 7.0 y 8.0 mostrando el 61 y 62 % de la actividad respectivamente. En cambio a pH 9.0 AmiJ33 mostró 67 % de actividad. Este resultado concuerda con el reportado para la amilasa de *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 (Gangadharan *et al.*, 2008) y la amilasa de *B. amyloliquefaciens* (Liu *et al.*, 2015) que presentan su mayor actividad a pH 5.0. Mientras que las amilasas de *Bacillus sp.* BK20 (Kubrak *et al.*, 2010), *Bacillus sp.* (Teodoro *et al.*, 2000), *B. subtilis* KIBGE HAS (Bano *et al.*, 2011) presentan su mayor actividad a pHs entre 6.0 y 8.0, en cambio

en trabajos realizados para *Bacillus. sp. BBM1* (Moreno *et al.*, 2009) la amilasa mantiene su mayor actividad a pH óptimo entre 5.0 y 7.0.

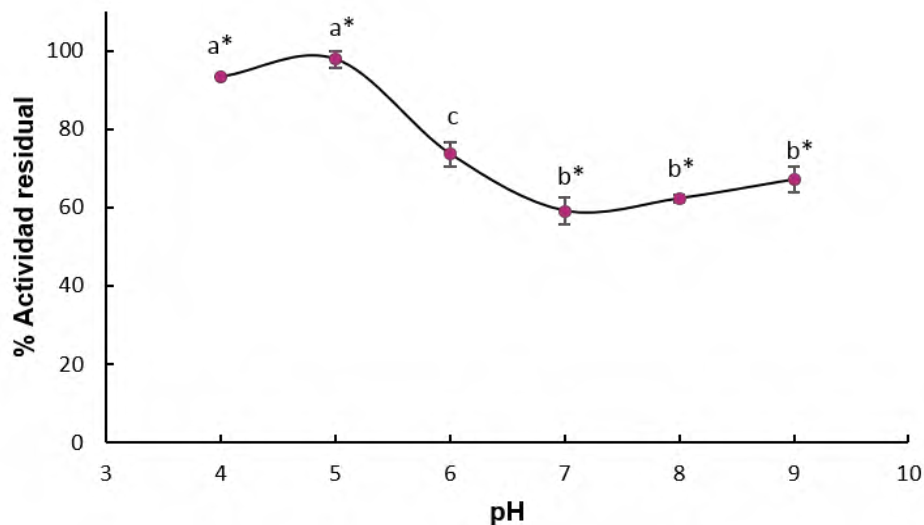


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de AmiJ33. Condiciones del experimento; 45°C, como sustrato almidón nativo, 0.12 U de AmiJ33, tiempo de reacción 1 h. Tukey, $p > 0.05$, $n=2$.

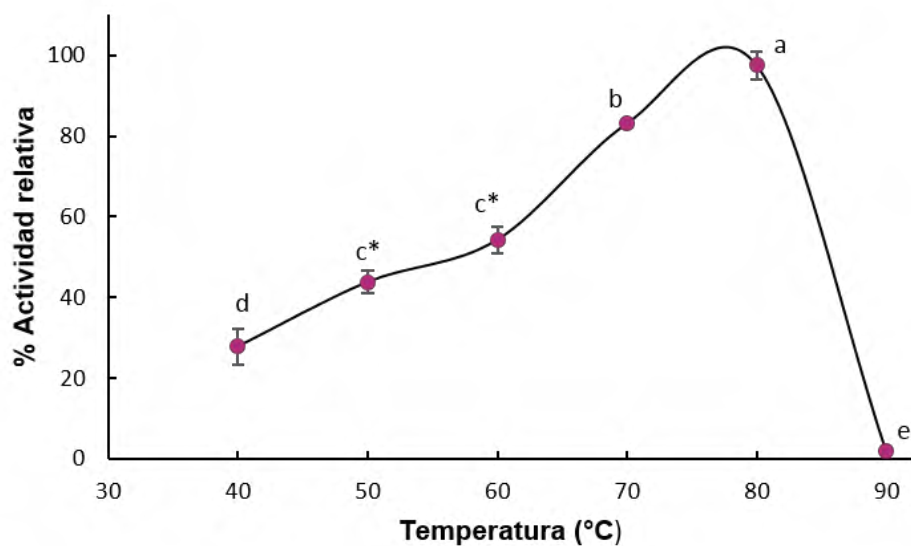


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33. Condiciones del experimento; temperaturas evaluadas 40-90°C, como sustrato almidón, 0.12 U de AmiJ33. Tukey, $p > 0.05$, $n=2$.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33 se evaluó a 40, 50, 60, 70 ,80 y 90°C (Fig. 18). A 40°C y 50°C AmiJ33 mantiene el 27 y 43 % de actividad respectivamente, en cambio a 60°C AmiJ33 mantiene el 54 % de su actividad, aumentando su actividad a 70 y 80°C con el 83 y 100 % (6.0 U/ml) respectivamente. A 90 °C AmiJ33 disminuye su actividad con el 1.9 %. Estos resultados concuerdan con los reportados para la amilasa de *B. licheniformis* CUMC305 (Vaseekaran *et al.*, 2010), *Bacillus sp* US100 (Ben Ali *et al.*, 1999), *Bacillus spp.* MK8 (Devi *et al.*, 2010) que presentan su mayor actividad entre 80 y 90°C. Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a los reportados para AmiJ33 (Montor *et al.*, 2014) difieren, tanto en el comportamiento de pH como en el pH óptimo se piensa que se debe a que se utilizó un amortiguador diferente para pH 6.0 (amortiguador de acetatos en el trabajo de Montor *et al.*, 2014 y amortiguador de fosfatos en el presente trabajo) posiblemente este cambio ocasionó una diferencia en la actividad de AmiJ33. En cuanto al efecto de la temperatura, los resultados del presente trabajo comparados con los resultados para AmiJ33 (Montor *et al.*, 2014) son muy similares ya que la mayor actividad se presenta a los 80°C y AmiJ33 pierde su actividad a los 90°C.

4.1.4.2 Estabilidad a pH sobre la actividad de AmiJ33

En cuanto al efecto de pH en la estabilidad, AmiJ33 se mantuvo estable a pH 5.0 con un 100 % (0.249 U/ml) de su actividad. Mientras que pH 4.0 mantuvo el 45.0 %, a pH 6.0 y 7.0 mostró el 79 y 67 % de actividad, respectivamente. A pH 8.0 y 9.0 mantuvo el 47.36 y 30.99 % actividad (Fig. 19). Estos resultados son semejantes a los reportados para la amilasa de *Bacillus sp.*AB68 (Aygan *et al.*, 2006) esta amilasa mantiene su estabilidad a pH entre 5.0-8.0, la amilasa de *B. subtilis* (Teztrakoglu *et al.*, 2013) muestra el 85 % de su actividad a pH 5.0 cuando la estabilidad fue evaluada por 24 h.

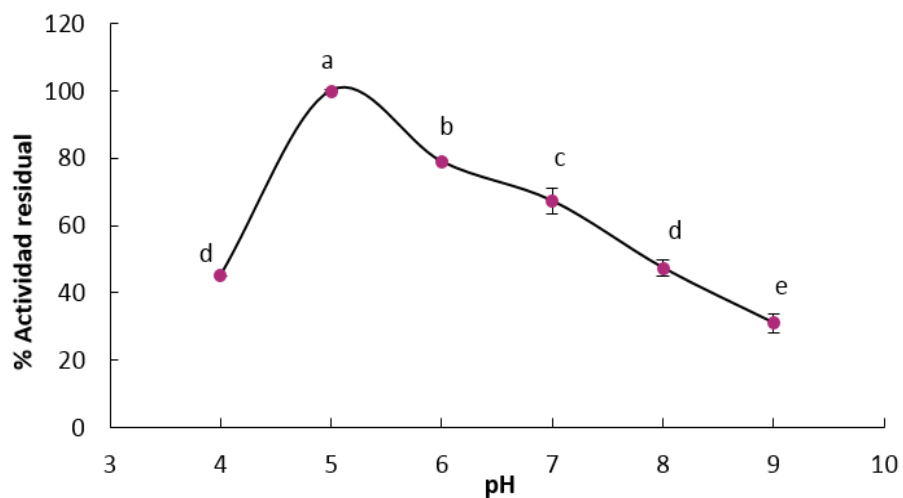


Figura 19. Estabilidad a pH sobre la actividad de AmiJ33. Condiciones del experimento; 45°C, como sustrato almidón nativo (10 g/L), 0.12 U de AmiJ33, tiempo de reacción 1 h. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

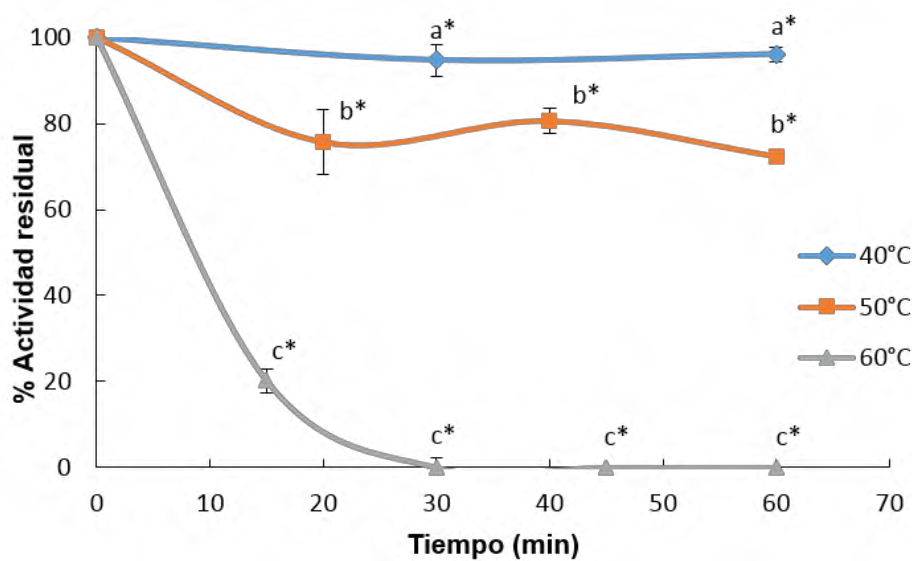


Figura 20. Termoestabilidad de AmiJ33. Condiciones del experimento; tiempo de reacción 1 h, como sustrato almidón nativo (10 g/L), 0.12 U de AmiJ33. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

AmiJ33 presentó una vida media de 16.5, 2.31 y 15 min a 40, 50 y 60°C, respectivamente. Con base a estos resultados AmiJ33 no es una enzima termoestable, pero a 40°C se mantiene estable hasta por 16 h (Fig. 20).

Estos resultados son similares a los reportados para la α -amilasa de *B. licheniformis* MTCC1483 (Dahiya y Rath, 2015), donde se describe que esta enzima mantiene el 100 % de su actividad en un periodo de 1 h a 40°C, en cambio a 50°C por 1 h mantiene el 40 % de actividad, comparando este resultado con el de AmiJ33, AmiJ33 tiene una ventaja sobre esta porque mantiene más del 60 % de su actividad a la misma temperatura y al mismo tiempo. A 60°C la amilasa de *B. licheniformis* mantiene más del 60 % de su actividad en un periodo de tiempo de 15 min mientras que AmiJ33 solo mantiene el 20 % de su actividad, a pesar de que AmiJ33 no es una enzima termoestable como la amilasa de *B. licheniformis*.

Por otra parte no fue posible evaluar la termoestabilidad de AmiJ33 a 70, 80 y 90°C ya que a estas temperaturas AmiJ33 se desnaturaliza. Como se muestra en la fig. 19, a los 60°C AmiJ33 solo mantiene el 20 % de su actividad a los 15 min, por tal motivo se llega a la conclusión de que AmiJ33 se desactivaría a los 70, 80 y 90°C durante 1 hora, que es el tiempo que demoró el experimento.

4.1.5 Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33

Para determinar el efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33 se evaluó su actividad a diferentes concentraciones de sustrato y con ello se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . La cinética descrita por AmiJ33 se ajustó al modelo de Michaelis Menten (Fig. 14). Los valores de K_m y V_{max} se determinaron mediante el software OriginLab 9.0 ajustando la gráfica al modelo de Michaelis, los resultados fueron para V_{max} 41.00 U/mg y K_m 10.6 mg/mL (ANEXO V) (Fig. 21). Estos resultados indican que AmiJ33 tiene poca afinidad por el almidón nativo. En comparación con trabajos similares AmiJ33 presenta valores parecidos de K_m a la reportada para *B. stearothermophilus* (14 mg/mL) (Marco *et al.*, 1996).

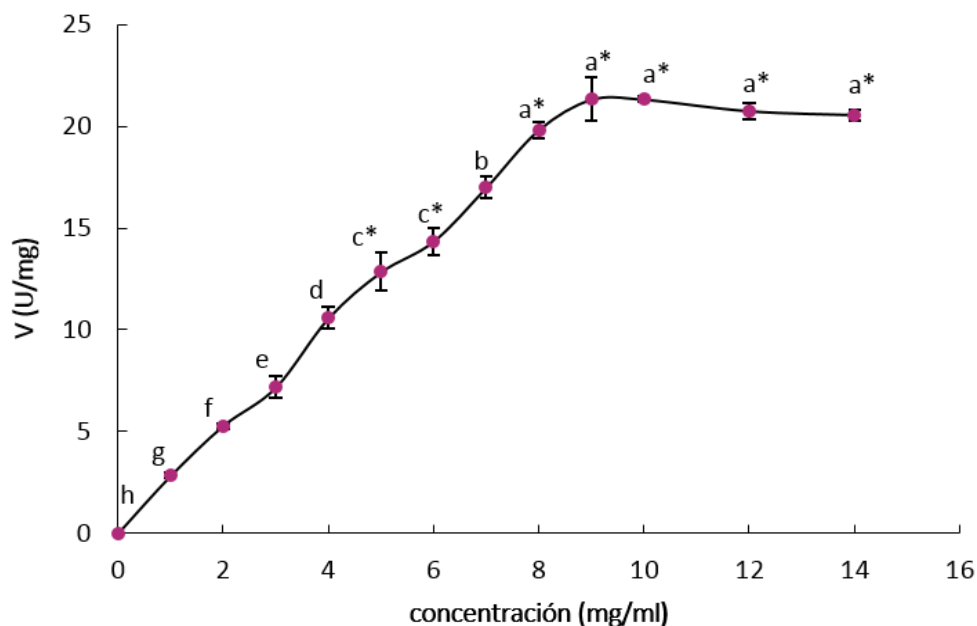


Figura 21. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33 de *B. amyloliquefaciens*. Condiciones del experimento; 45°C, como sustrato almidón nativo (10 g/L), 0.12 U de AmiJ33. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

4.1.6 Hidrólisis enzimática del almidón comercial con AmiJ33 y sus productos de reacción

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de operación de AmiJ33 se analizó su comportamiento en almidón comercial (Jalmek), se analizaron los productos de hidrólisis generados y el grado de hidrólisis en los gránulos del almidón. La reacción de hidrólisis del almidón insoluble se realizó por 180 min, donde se observó que durante los primeros 40 min la hidrólisis del almidón por medio de AmiJ33 fue muy lenta, dando lugar a una baja concentración de azúcares reductores. Después de los 40 min hasta los 140 min se observó un aumento en la concentración de azúcares reductores, la hidrólisis del almidón fue más rápida, finalmente entre los 160-180 min la producción de azúcares fue constante 2.3 g/L y 2.307 g/L respectivamente, alcanzando la máxima producción de azúcares reductores a los 140 min con un total de 2.5 g/L (Fig. 22).

Los procesos amilolíticos son una reacción heterogénea altamente dependiente de la estructura granular del almidón. Varios autores han reportado varios factores que afectan la susceptibilidad del almidón nativo a la α -amilasa en relación al origen botánico del almidón o a la fuente de la α -amilasa (Kansou *et al.*, 2015). Dentro de los factores con mayor importancia son la morfología de los gránulos de almidón, la presencia de poros o canales en la superficie del almidón podría favorecer la difusión de la enzima hacia el interior del gránulo, acelerando la velocidad de hidrólisis (Blazek & Gilbert, 20; Dhital *et al.*, 2010; Planchot *et al.*, 1995). Otros factores importantes que deben ser considerados en la velocidad de hidrólisis del almidón son el tipo de cristalinidad (patrón de difracción A, B o C), distribución de la longitud de las cadenas (Blazek y Gilbert, 2010; Gérard *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2015; Lauro *et al.*, 1999; Tester *et al.*, 2006). Algunos autores han reportado que la α -amilasa pancreática de porcino degrada almidones tipo A (maíz, trigo y arroz) mucho más rápido que los almidones tipo B (papa y amilomaíz). Estas diferencias en la velocidad de hidrólisis podrían ser explicadas por las diferencias en aspectos estructurales que presentan las diferentes fuentes de almidón (Blazek & Gilbert, 2010; Tester *et al.*, 2006).

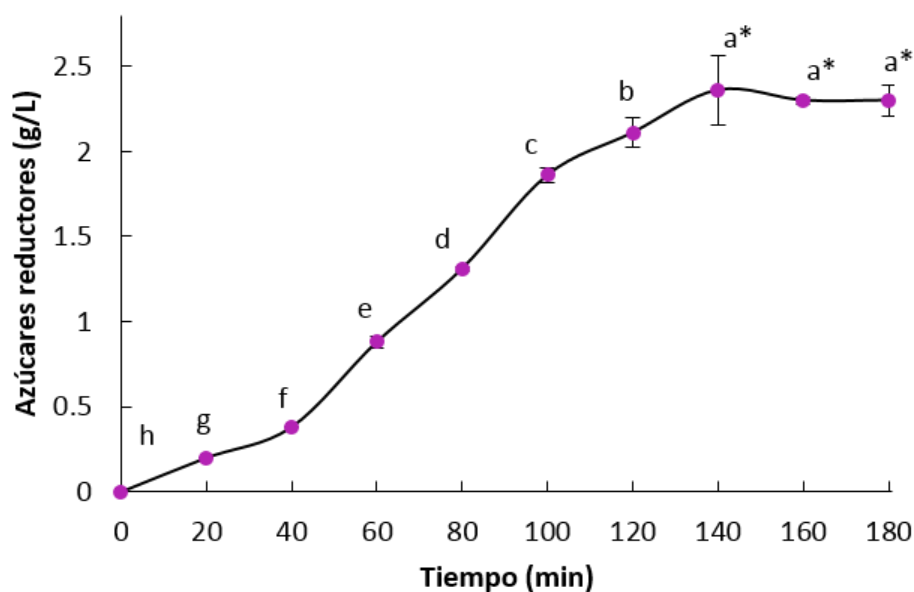


Figura 22. Producción de azúcares reductores por medio de la hidrólisis del almidón comercial empleando la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens*. Condiciones del experimento; 45°C, como sustrato almidón nativo (10 g/L), 44.2 U/mg de proteínas. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

Durante la cinética también se observaron los productos de hidrólisis del almidón con AmiJ33, donde están presentes: glucosa (GP1), maltosa (GP2) y maltopentosa (GP5), predominando la glucosa. Durante los primeros 20- 80 min de hidrólisis, se observó una baja cantidad de glucosa y maltosa, lo cual correlaciona con la baja cantidad de azúcares reductores observados en ese periodo (Fig. 23). Después de los 100-160 min la generación de productos (glucosa, maltosa) se incrementó, lo que correlaciona con la máxima cantidad de azúcares reductores observados. En cuanto a los productos, al final de la reacción, se observó principalmente la presencia de glucosa (GP1) y maltosa (GP2) (Fig. 23). Estos resultados son similares a los reportados para la α -amilasa de *B. subtilis* AX20 (Mohsen *et al.*, 2005) donde se observó que los productos finales de la hidrólisis del almidón fueron: glucosa y maltosa. En cambio otras amilasas como las de *Bacillus sp.* 18, *Bacillus sp.* BL3, *Bacillus sp.* 12B (Gligorijevic *et al.*, 2014) en sus productos de hidrólisis generan principalmente: glucosa, maltotriosa y maltopentosa.

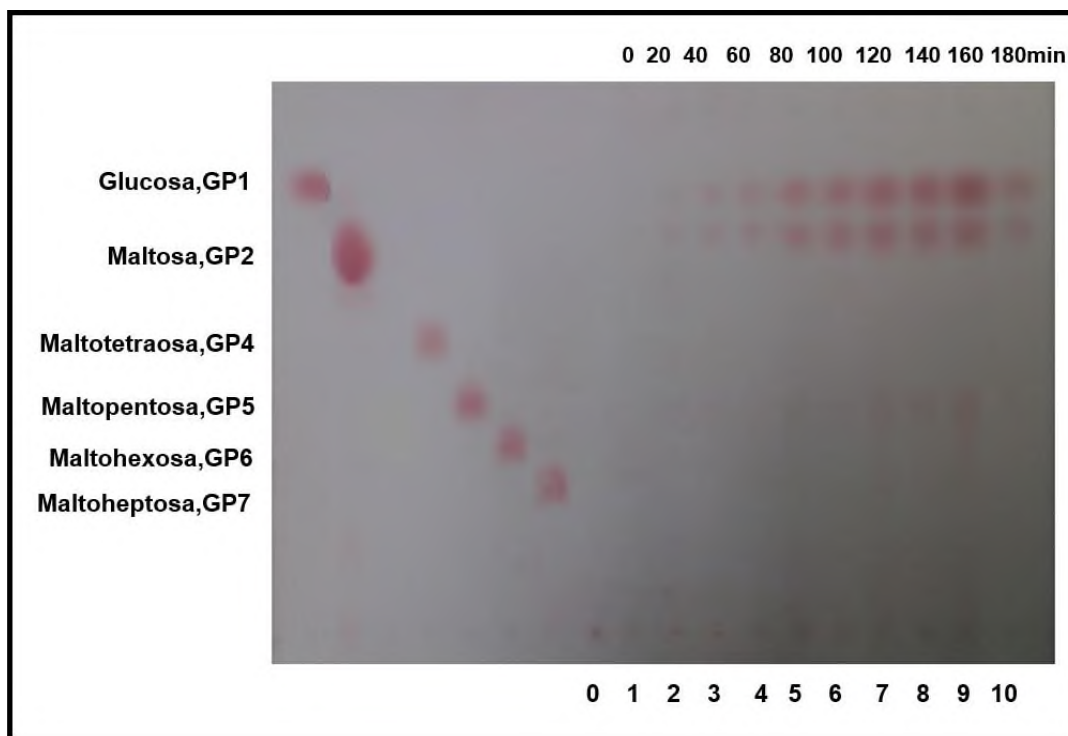


Figura 23. Cromatografía en capa fina (TLC) de las reacciones de AmiJ33 (10 g/L) empleando como sustrato almidón (10 g/L). Sistema: Butanol/etanol/agua 30:50:20. Estándares: GP1, GP2, GP4, GP5, GP6 y GP7, 0; Almidón insoluble pH 5.0 (control negativo), los carriles 1-10 son productos de hidrólisis de 0-180 min.

4.1.7 Hidrólisis enzimática del almidón comercial con la enzima comercial Licuamil 340

La hidrólisis del almidón insoluble comercial con Licuamil 340, se realizó durante 180 min. Se observó que durante los primeros 20-60 min la hidrólisis fue muy rápida, generando una alta concentración de azúcares reductores 1.62-5.55 g/L respectivamente. Después de los 80 hasta los 140 min se observó que la producción de azúcares reductores fue constante 5.5, 5.6, 5.7 y 5.76 g/L respectivamente, finalmente entre los 160-180 min la producción de azúcares reductores disminuyó 5.44 y 5.12 g/L respectivamente (Fig. 24). Es decir la reacción enzimática alcanzó rápidamente el equilibrio.

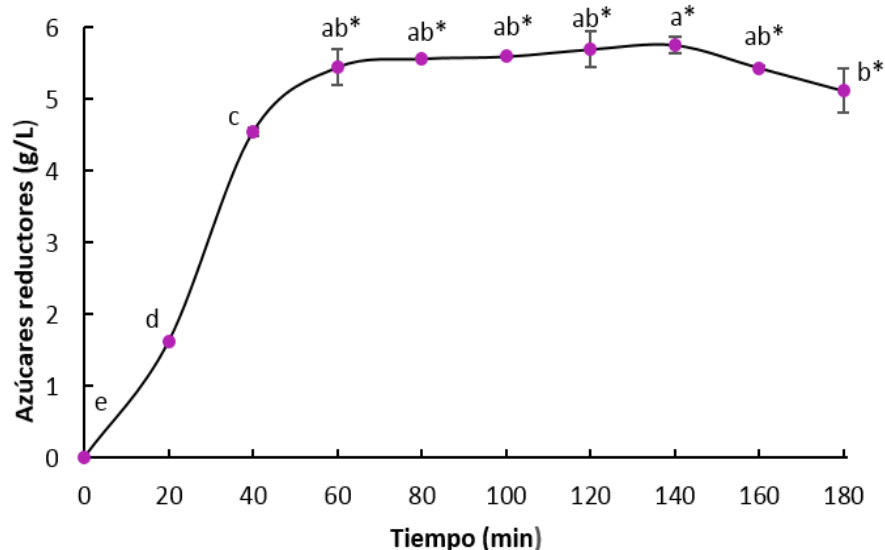


Figura 24. Producción de azúcares reductores por medio de la hidrólisis del almidón comercial empleando la enzima comercial Licuamil 340. Condiciones del experimento; 70°C, como sustrato almidón nativo (10 g/L), 44.2 U/mg de proteína. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

Durante la cinética también se observaron los productos de la hidrólisis del almidón, presentes: glucosa (GP1), maltosa (GP2), maltotriosa (GP3) y maltotetraosa (GP4). Entre los primeros 20-60 min se observó una mayor cantidad de productos hidrolizados debido a que la hidrólisis del almidón es muy rápida. Después de los 80-140 min se observó que los productos finales de la hidrólisis permanecen constantes. Finalmente entre los 160-180 min la generación

de productos disminuye. En cuanto a las maltotreosa generadas por la hidrólisis con Licuamil 340 se observó una menor cantidad (Fig. 25).

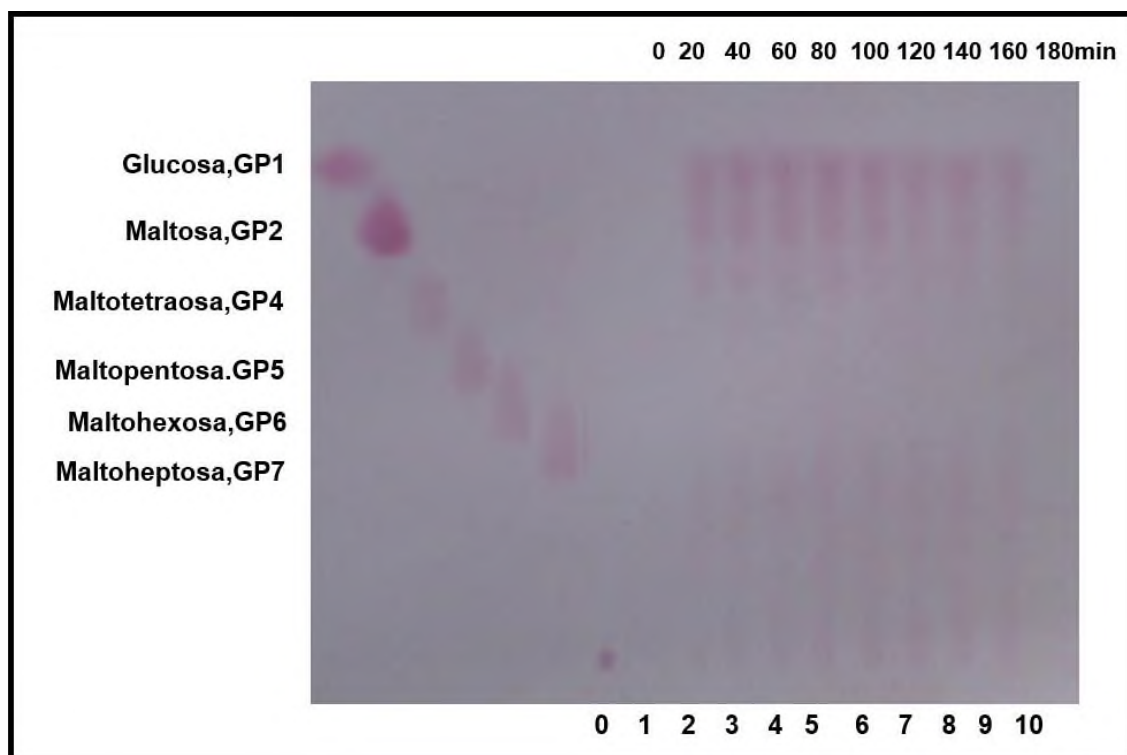


Figura 25. Cromatografía en capa fina (TLC), de las reacciones de Licuamil 340, empleando como sustrato almidón (10 g/L). La placa fue eluida una vez en el sistema: Butanol/etanol/agua 30:50:20. Estándares: GP1, GP2, GP4, GP5, GP6, GP7, 0; Almidón insoluble pH 5.0 (control negativo), 1-10; productos de hidrólisis de 0-180 min.

La hidrólisis del almidón comercial con AmiJ33 durante los primeros 0-60 min fue muy lenta obteniéndose finalmente 0.87 g/L de azúcares reductores, en comparación con la enzima comercial Licuamil 340, durante los mismos tiempos, la hidrólisis del almidón fue rápida obteniéndose 5.45 g/L de azúcares reductores, durante los 80-140 min Licuamil se mantuvo obteniendo alrededor de 5.43-5.76 g/L de azúcares, mientras que AmiJ33 aumentó la producción de azúcares reductores obteniendo 2.37 g/L. Finalmente durante los 140-180min AmiJ33 mantiene finalmente 2.27 g/L, mientras que Licuamil mantiene 5.2 g/L de azúcares reductores, casi el doble que AmiJ33 (Fig. 26). Licuamil es una enzima comercial por tal motivo tiene todas las características deseadas para poderla incorporar en algún sector industrial, y poder trabajar con ella sin ningún problema, mientras que AmiJ33 es una enzima aislada la cual se caracterizó

bioquímica y enzimáticamente, a pesar de las desventajas que tiene AmiJ33 sobre Licuamil las cuales son: menor producción de azúcares reductores, la estabilidad a temperaturas. AmiJ33 tiene algunas ventajas como la vida media a 40°C por 16 h, la temperatura óptima es de 80°C, aunque no es estable a esa temperatura, AmiJ33 se puede mejorar genéticamente para adquirir características deseadas y así aumentar con ello la producción de azúcares reductores.

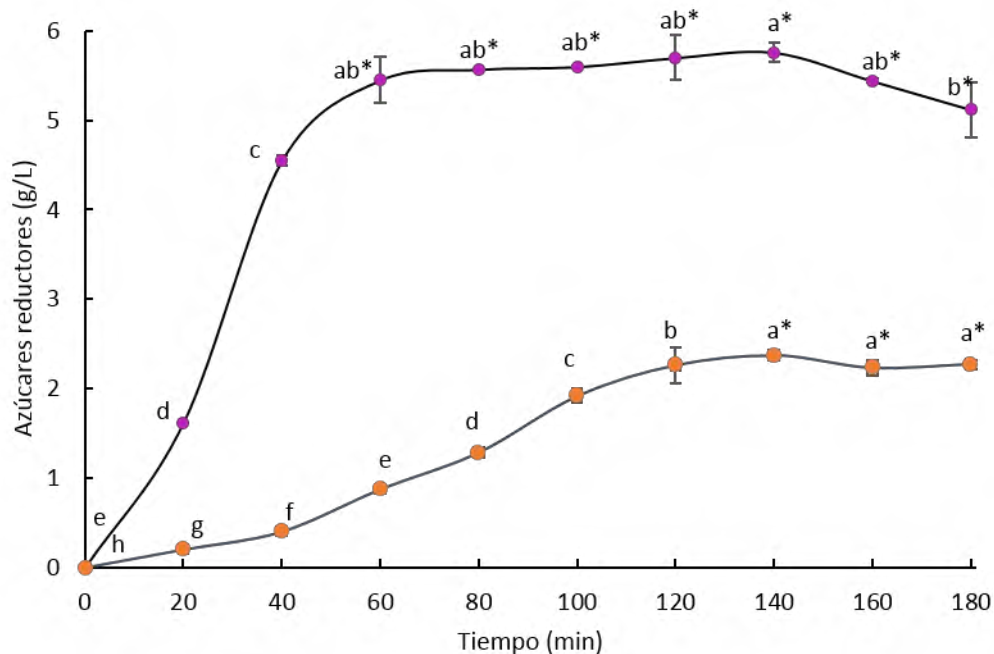


Figura 26. Comparativa de la hidrólisis del almidón nativo con ● AmiJ33 y la enzima comercial ● Licuamil 340. Condiciones del experimento; 45°C y 70°C, respectivamente. 44.2 U/mg de proteína y como sustrato almidón nativo (10 g/L). Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

CONCLUSIONES

La α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) se recuperó saturando el extracto crudo enzimático al 60 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante se corroboró el peso molecular de AmiJ33 que fue aproximadamente de 50 kDa.

AmiJ33 mostró su mayor actividad a pH 5.0, también mostró su mayor estabilidad a ese pH 5.0 manteniendo el 100 % de su actividad.

La temperatura óptima de AmiJ33 es de 80°C. Aunque sólo es estable entre 40 y 50°C.

AmiJ33 tiene una vida media a 40, 50 y 60°C de 16.5 h, 2.31 h y 15 min respectivamente.

AmiJ33 en comparación con Licuamil hidroliza muy poco el almidón comercial (Jalmek), AmiJ33 alcanza a generar 2.5 g/L de azúcares reductores en 1 h, mientras que Licuamil en ese mismo tiempo genera 5.45 g/L de azúcares reductores, casi el doble que AmiJ33.

Los productos de hidrólisis de AmiJ33 fueron: Glucosa, maltosa y maltopentosa, mientras que los de Licuamil fueron: Glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotreosa.

Se acepta la hipótesis de este trabajo, ya que AmiJ33 presenta una mayor actividad a pH 5.0 y a 80°C, aunque a esta temperatura AmiJ33 no es estable. Debido a que el pH óptimo de AmiJ33 es de 5.0 se puede proponer para las industrias de panificación, textil y alimentaria.

PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar a AmiJ33 empleando diferentes tipos de almidones como sustrato.
- ❖ Determinar el comportamiento cinético de AmiJ33 en un rango de concentración de sustrato de 10 g/L a 150 g/L.
- ❖ Cuantificar los productos finales de la hidrólisis del almidón por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC).

REFERENCIAS

- Adinarayana, K.,** Suren, S. **2006.**Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus sp.* AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*.39:1399–1404
- Atichokudomchai, N.,** S. Shobsngob y S. Varavinit. **2000.** Morphological Properties of Acid modified Tapioca Starch. *Starch/Starke*. 52:283-289.
- Atwell, WA.,** Hood, L.F., Lineback, D.R., Varriano-Marston, E., Zobel, H.F. **1988.** The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal food world*. 33:306-311.
- Al-Qodah, Z.,** Daghtani, H., Geopel, P., Lafi, W. **2007.** Determination of kinetic parameter of α -amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus*. *African Journal of Biotechnology*.6:699-706.
- Aygan, A.,** Arikan, B., Korkmaz, H., Dincer S., Colak, O. **2006.** Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerantalkaliphilic *Bacillus sp.* AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*.39:547-553.
- Akcan, N. 2011.** High Level Production of Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in Submerged Fermentation. *Romanion Biotechnological Letters*. 16:6833-6839.
- Bano, S.,** Qader, S., Aman Afsheen., Syed M., Azhar A. **2011.**Purification and characterization of α - amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 12:255-261.
- Badui, S. 2006.**Química de los alimentos 4Ed. México: Pearson education.
- Ball, S.,** Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N., Tirtiaux, C. **2011.** The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal Explained Botanicals*. 54:207-233.
- Ben Ali, M.,** Mezghani, M. Bejar S. **1999.**A thermostable a-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus sp.* US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. *Enzyme Microbiology Technology*. Elsevier science.24:584-589.
- Boyer, S. 1987.** Corn: chemistry and technology. *American Association for Clinical Chemistry*. 227-253.
- Burhan, A.,** Nisa, U., Gokhan, C., Ashabil, A., Osman, G. **2003.**Enzymatic properties of novel thermoestable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6.*Process Biochemistry*.38:1397-1403.

Blazek, J., & Gilbert, E. P. 2010. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. *Biomacromolecules*.12:3275–3289.

Cabra, J., M, Sánchez. 1997. Biotecnología para el desarrollo en Colombia. *Innovación y ciencia*. 6: 44-52.

Carrera, J.E. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1:15

Calvert, P. 1997. The structure of starch. *Nature*. 25: 338-339.

Chica L. 1996. Sacarificación del almidón de papa. Trabajo de pregrado. Bogotá-Colombia: Universidad Nacional de Colombia: 165 páginas.

Dahiya, P., Rathi, B. 2015. Characterization and application of alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive. *International Food Research Journal*. 3:1293-1297.

Davies G., and B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853-859.

Da Lagea, JL., Etienne, GL., Danchinc, EGL. Casane, D. 2007. Where do animal α -amylase come from an interkingdom trip. *Federation of European Biochemical societies*.581:3927-3935.

De Azevedo, A., De marco, J., Felix, C. 2000. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciososa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. 171-175.

Demirkan E. 2011. Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turk Journal Biology*.35:705-712

Dhital, S., Shrestha, A. K., & Gidley, M. J. 2010. Effect of cryo-milling on starches: Functionality and digestibility. *Food Hydrocolloids*.2–3:152–163.

Electroforesis de proteínas. **2006.** Recuperado el 6 de diciembre del 2015, de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-protocolos.pdf>

Georg-Kramer., J.E., Mundstock, E.C. and Cavalli-Molina., S. 2001. Developmental expression of amylase during barley malting. *Journal of Cereal Science* 33 (2001) 279±288.

Gangadharan, D., Nampoothiri, M, K., Sivaramakrishnan, S. 2009. Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Applied Biochemistry Biotechnology*.158:653-662.

Garcia, G., Quintero, R., Lopez, M. **1998.** Biotecnología alimentaria. Mexico: Limusa. 537-539.

García, P.H.M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico.12:31-41.

Grand View Research-Market Research & Consulting. “Enzymes Market Analysis By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases) And Segment Forecasts To 2020. Recuperado el 7 de diciembre del 2015 en: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>

Gérard, C., Colonna, P., Bouchet, B., Gallant, D. J., & Planchot, V. **2001.** A multi-stages biosynthetic pathway in starch granules revealed by the ultrastructure of maize mutant starches. Journal of Cereal Science.1:61–71.

Gupta, R., G. Paresh, H. Mohapatra, V. Kumar, and B. Chauhan. **2003.** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38(11):1.599-1.616.

Funglie, K, C., and Oates, G, C. **2001.** Starchs markets i Asia. In: Sweet potato post-harvest research and development in china.

Hendriksen, P.M., Pedersen, S., Bisgard-Frantzen H. **1999.** A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application. WO 99/35325.

Hernández, N. A. 2011.Evaluación de la actividad amilolítica y producción de ácido glucónico de aureobasidium pullulans en cultivos por lote y semilote utilized almidón extraído de cebada maltera de baja calidad. 28 de Noviembre. Del instituto politécnico nacional sitio web:<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12576>.

Hesseltine, CW., Wang, HL. **1979.** Fermented Foods. Journal Scientific Food Agriculture. 30:839.

Hoover, R., and Y. Zhou. **2003.** *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α - amylase and resistant starch formation in legumes. A review. Carbohydrate Polymers. 54:401-417.

Hung, P., and N. Morita **2005.** Physicochemical properties and enzymatic digestibility of starch from edible canna (*Canna edulis*) grown in Vietnam. Carbohydrate Polymers. 61(3):314-321.

Integrated cassava Project (27 de Nov del 2015) recuperado el 28 de Nov del 2015 de <http://www.cassavabiz.org>

Jacobs, H., Mischenko, N., Koch, M., Eerlingen, R., Delcour, J., Reynaers, H. **1998.** Evaluation of impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato

starches: A differential scanning calorimetry and small angle X-ray scattering study. Carbohydrate Research. 306: 1-10.

Jacobs, H., Delcour, J. **1998.** Hydrothermal modification of granular starch with retention of the granular structure: A Review. Journal Agricultural Food Chemistry. 46(8): 2895-2905.

Jovanovich, G., Zamponi, R.A., Lupano, C.E., Añon, M.C. **1992.** Effect on water content on the formation and dissociation of the Amylase-lipid complex in wheat flour. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 40:1789-1793.

Kansou, K., Buléon, A., Gérard, C., & Rolland-Sabaté, A. **2015.** Amylolysis of maize mutant starches described with a fractal-like kinetics model. Carbohydrate Polymers.123:266–274.

Kang, K. W., Echarri, J.M., Llorente, C.L. **2013.** Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del limf facultad de ingeniería unlp. Segundas Jornadas de Investigación y Transferencia. 660-665.

Kaur, L., Singh, N., Singh J. **2004.** Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. Carbohydrates Polymers. 55:211-223.

Kim, TU., Gum GB., Jeong, JY., Young, SC. **1995.** Purification and characterization of a maltotreosa forming alkaline alpha amylase from a alkalophilic *Bacillus* strain, GM 8901. Application environ Microbiology.61:3105-3112.

Kirk, O., Borchert, TV., Fuglsang, CC. **2002.** Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnology.13:345-351.

Kubrak, I., Storey M, J., Storey B, K. Lushchak, I, V. **2010.** Production and properties of α -amylase from *B. sp.* BKL20. Can Journal Microbiology. 56:279-288.

Khoo, SL., Amirul, AA. Kamaruzaman M., Nazalan N., Azizan, MN. **1994.** Purification and characterization of α - amylase from *Aspergillus flavus*. Folia microbiology.39:392-8.

Knutzon, C.A., Grove, M. **1994.** Rapid method for estimation of amylose in maize starches. Cereal Chemistry. 72(5):469.

Laemnli, U.K., **1970.** Nature 227:680-685.

Lauro, M., Forssell, P. M., Suortti, M. T., Hulleman, S. H. D., & Poutanen, K. S. **1999.** Alpha-Amylolysis of large barley starch granules. Cereal Chemistry.6:925–930.

Lewandowicz, G., Soral-Smietana, M. **2004.** Starch modification by iterated syneresis. Carbohydrate Polymers. 56(4):403-413

- Light, M.J. 1990.** Modified food starches: Why, What, Where and How. National starch and Chemical Co. Bridgewater, NJ. 35(11):1081-1092
- Lineback, D.R., Rasper, V.F. 1988.** Wheat carbohydrates. In: Wheat Chemistry and technology. 1:227-372.
- Liu, X., Jia, W., Cheng K., Wang, M., Yang, S., Chen, H. 2015.** Screening, Gene Cloning, and Characterizations of an Acid-Stable α -Amylase. Journal Microbiology Biotechnology.6:828-836.
- Ly HD, and S G Withers. 1999.** Mutagenesis of glycosidases. Annu Rev Biochem. 68:487-522.
- López, E., Martín, J. C. 2009.** Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. Revista Colombiana de Química. 38:395-408.
- Mali, S., Grossman M.V.E., García M.A., Martino M.N., Zaritzky N. 2006.** Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. Journal of food engineering. 75:453-460.
- Mamo, G., Gessesse, A.1999.**Effect of cultivation conditions on growth and alpha production. Biotechnology Tecnology.11:447-450.
- Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G. 1998.** Structure. 6:281-292.
- Martínez, T., Alarcon, F., Lopez, M., Moyano, F. 2000.** Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. Electrophoresis.14:2940-3.28 de Nov 2015. De pubmed base de datos.
- Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S., Furukawa, K. 2005.** Comparative characterization of raw starch hydrolyzing -amylases from various *Bacillus* strains. Enzyme Microbiology Technology. 37:410-416.
- Miller, G.L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426-428.
- Montor, J.J., Olvera, C., Reyes, D., Sachman, B., Ramírez, L.P., Del Moral S. 2014.** Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region. Nova Scientia. 6:39-59.
- Montor, J.J. 2015.** Estudio de la α -amilasa recombinante amij33r y del gen que la codifica. Tesis de maestría. Sanjuán Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, México.

Nakamura, N., Watanabe, K., Horikoshi, K. **1975.** Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *bacillus* no. 202-1, an alkalophilic microorganism. *Biochemistry Biophysical.*39:188-93.

Company, Novozymes. 2011. The Novozymes Report 2011.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. **2000.** Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry.* 31:135-52.

Park, J., Suwanto, A., Tan, I., Nuryanto, T., Lukman, R., Wang, K. Jan, J. **2013.** Molecular Cloning and Characterization of a Thermostable α -Amylase Exhibiting an Unusually High Activity. *Food Scientific Biotechnhology.*

Perez, H. 2000. Electroforésis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá.*2:31-41.

Planchot, P.D., Colonna, J., Gallant and Bouchet, B. **1994.** Extensive degradation of native starch granules by α - amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Cereal Science.* 21:163-171.

Quintero, M., Montoya, O., Gutiérrez P. **2010.**Purificación y caracterización de una amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus sp.* BBM1. *Dyna.*162:31-38.

Reed, G., 1975. Enzymes in Food Proceeding. New York San Francisco. Academic press New York 10005 U.S.A

Rye C.S and S G Withers. 2000. Glycosidase mechanisms. *Cur Opin Chemistry Biology.* 4:573-580.

Rubinson, K.A., Robinson, J.F.**2001.** Análisis instrumental. Prentice Hall. España

Saito, NA.1973.Thermophilic extracelular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochemistry Biophysical.*155:290-8.

Singh, N., Chawla, D., y Singh, J.**2004.** Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starches. *Food chemistry.* 86:601-608.

Schellart, JA., Visser FMW., Zandstva, T., Middleahover, WJ. **1976.** Starch degradation by the mold *Trichoderma viride* I. the mecanism of degradation. *Antonie van leeuwenhock Journal Microbiology Serology.*42:229.

Sumer, J.B., Howel, S. **1935.** A method for determination of saccharase activity. *Journal Bacteriology.*108:51-54.

- Sodhi, H.,** Sharma, K., Gupta, J. Soni S. **2005.** Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*.40:525-534.
- Srichuwong, S.,** Jane, J.L. **2007.** Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: a review, *Food Scientific Biotechnology*.16:663-674.
- Li, J.H.,** Vasanthan, T., Hoover, R., Rossnagel, B.G. **2004.** Starch from hull-less
- Teodoro de Souza, C.,** Martins, L. **2000.** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:298-302.
- Tester, R. F.,** Qi, X., & Karkalas, J.**2006.** Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*.1–2:39–54.
- Tezlakoglu, M.,** Akbulut, N., Issever, S., Gumusel, F. **2013.** Ligase-Independent Cloning of Amylase Gene from a Local *Bacillus subtilis* Isolate and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *Application Biochemistry Biotechnology*.171:263-278.
- Tonkova, A. 1998.** Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microbiology Technology*. 22:678-686.
- Tovar, J., A. de Francisco, I.** Bjorck and N. Asp. **1991.** Relationship between microstructure and in vitro digestibility of starch in precooked leguminous seed flours. *Food Structure*. 10:19-26.
- Tucker, G.A.,** Woods L.F.J. **1991.** Eds. *Enzymes in Food Processing*. Blackie and Son Ltd. London.
- Van der Maarel, M.J.;** van der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. **2002.** Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journals Biotechnology*. 94:137-155.
- Vaseekaran, S.,** Balakumar, S., Arasaratnam, V. **2010.** Isolation and identification of a bacterial strain producing thermoestable α -amylase. *Tropical Agricultural Res*.22:1-11.
- Vaclavick, A. V.** 2002. *Essentials of food science*. 1ª edición (pág. 45-59). España: Acribia
- Vihinen, M.,** Mantsala, P. **1989.** Microbial amylolytic enzymes. *Biotechnology laboratory*. 24: 329-418.
- Villalobos, R.,** Hernández, E., Rodríguez, M., Delgado, R., Vázquez, N. 2011. Obtención y caracterización de almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) acetilado a diferentes grados de sustitución. *Revista de química teórica y aplicada*. 67:294-300.

Vermeulen, R., Goderis, B., Delcour, J. **2006.** An X-ray study of hydrothermally treated potato starch. Carbohydrate Polymers. 64:364-375.

Walker, G.T., Whelan, W.J. **1960.** Hidrolysis of starch by microbial amylase. Biochemical Journal. 76:257-262.

WISEMAN, A. 1985. Manual de biotecnología de las enzimas. Zaragoza España:Acribia

www.megazyme.com/select-an-industry/textiles-industry

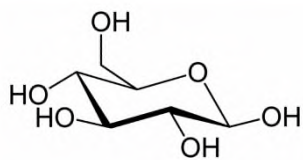
V-Labs N.p., 2015. Web. 29 Noviembre 2015.

Yabuki, O., Ono, N., Hoshino, K., Fukui, S. **1977.** Rapid induction of α - amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. Application Environment Microbiology.26:47-51.

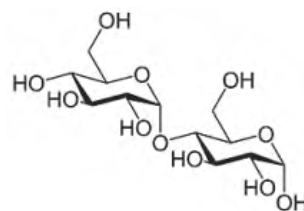
Zhang, P., Whistler R.L., BeMiller, J.N., and Hamaker, B.R. **2005.** Banana starch: Production, physicochemical properties, and digestibility review. Carbohydrate Polymers. 59:443-458.

ANEXOS

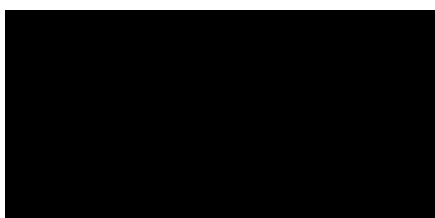
ANEXO I. PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LAS α -AMILASAS



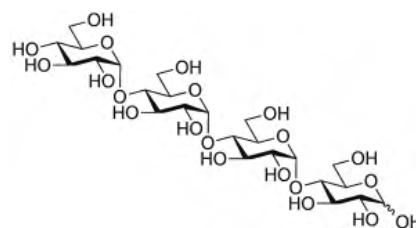
Glucosa (DP1)
www.v-labs.com



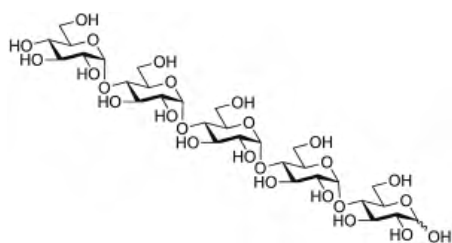
Maltosa (DP2)
www.v-labs.com



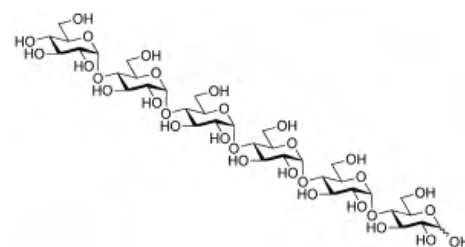
Maltotriosas (DP3)
www.v-labs.com



Maltotetraosa (DP4)
www.v-labs.com



Maltopentosa (DP5)
www.v-labs.com



Maltohexosa (DP6)
www.v-labs.com

ANEXO II. SECUENCIA GENÉTICA Y SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE AmiJ33

Gen de AmiJ33

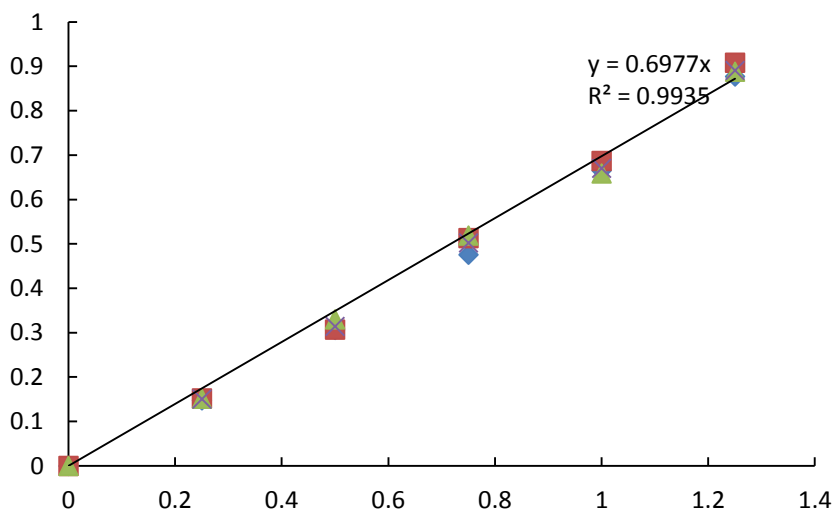
```
AGGCGTTCTGTTTTTGCTTCGGTATGTCATTGTGAAGCTGTCTTACAGAAGAGCGATAAA 60
AGAAGTGAAAAAGAAATCATCTTGATAGGTGGTTTCTTTTTTTGTTGATCTGATAGGAAT 120
ATAGATTTGATTTCACTCTGACACGTTGCTTTGATAGAGAGTGTGTGATAAGTTGAAATG 180
AAAGCGTTAACAAAATTCTCCAGTCTTCACAACATTCGAAAGGGGAAGCTGAAGAAAGG 240
GTAAGAGGAATTTTGTACTCCGCAGTCAGTCTTCAAAAATCAAATAAGGAGTGTCAAAA 300
ATGTTTGAAAAACGATTCAAAACCTCTTTACTGCCGTTAGTCGCCGGATTTTTATTGCTG 360
TTTCATTTGGTTTTGTGTCAGGGCCTGCGGCTGCAAACGCTGAAACCGCTGACAAATCAAAT 420
GAGGTGACCGCATCTTCAGTCAAAAGCGGAACCATCCTTCATGCCTGGAATTGGTCATTC 480
AATACGTTAACACAAAATATGAAAGATATTTCGTGATGCAGGCTATGCAGCCATTCAGACG 540
TCTCCGATTAACCAAGTAAAGGAAGGGAACCAAGGAGATAAGAGCATGAGGAATTGGTAC 600
TGGCTGTATCAGCCGACATCGTACCAAATCGGCAACCGTTACTTAGGAACTGAACAAGAG 660
TTTAAGGACATGTGCGCAGCCGCAGAAAAATATGGCGTAAAAGTCATTGTGCGATGCGGTC 720
ATCAATCATACGACCAGTGATTATAGCGCGATTCTGACGAGATTAAGCGTATTCCAAAC 780
TGGACCCATGGAACACACAAATTAAAAATTGGTCGGACAGATGGGATGTCACTCAAAAT 840
TCACTATTGGGGCTGTATGATTGGAATACTCAAAATACTGAGGTGCAAACCTATCTGAAA 900
CGCTTCTTGAAAGAGCATTGAATGACGGAGCGGACGGATTCCGTTATGATGCTGCCAAG 960
CATATAGAGCTTCCGGATGACGGGAATTACGGCAGCCGATTTTGGCCGAATATCACAAAT 1020
ACAGCGGCGGAATTCCAATACGGAGAAATCCTGCAAGACAGCGCGTCCAGAGATACTGCT 1080
TATGCGAATTATATGAATGTGACCGCTTCAAACATATGGACATTCCATCAGGTCCGCCTTG 1140
AAGAACC GCAATCTGAGTGTGTGCAATATTTCCCATTATGCATCTGATGTGTCTGCGGAC 1200
AAATTGGT CACATGGGTGGAATCACATGATACGTATGCCAATGATGAGGAAGAGTCTACA 1260
TGGATGAG CGATGACGATATCCGTTTAGGCTGGGCAGTGATCGGTTCCCGCTCAGGAAGT 1320
ACACCTCT TTTCTTTTCCAGACCTGAGGGCGGAGGAAATGGTGTAAGATTTCCCGGAAAA 1380
AGTCAAAT AGGCGATCGCGGGAGTGCATTATTTAAAGATCAAGCGATCACTGCGGTCAAT 1440
ATCTTTCACAATGTAATGGGCGGT CAGCCTGAGGAACTCTCGAATCCGAATGGGAACAAT 1500
CAAATCTTTATGAATCAGCGCGGCTCAAAGGCGTTGTGCTGGCAAATGCAGGATCGTCT 1560
GCCGTTGCCGTCAATACGTCAACGAAATTACCTGACGGCAGGTATGATAATAGAGCCGGC 1620
ATCGGTTCA TTTCAAGTGACGAACGGTAAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGATCCGTT 1680
GCTGTTCT TTTATCCTGACGATATCGGAAATGCGCCTCATGTCTTCCTTGAGAATTATCAA 1740
ACGGGAGCAGTCCATTCTTTCAACGATCAGCTGACGGTCACCCTGCGTGCAAATGCGAAA 1800
ACAACAAA AGCCGTTTATCAAATCAATAATGGGCAGCAGACGGGATTTAAGGACGGAGAC 1860
CGATTAACGATCGGAAAAGGAGATCCAATCGGCACGGCATAACGACATCAAGTTAACC GGA 1920
ACGAACAG CGAGGGTG CAGCAAGAACCCAAGAAATACACGTTTGTCAAAAAGACCCGTCT 1980
CAAGCCAACATCATTTGGCTATCAGAATCCGGACCATTGGGGCCAGGTAAATGCTTATATC 2040
TATAAACATGATGGAGGCAGGGCCATAGAATTAACCGGATCGTGGCCGGGGAAAGCCATG 2100
ACTAAGAATGCAGATGGAATTTACACGCTGACACTGCCTGAGAATGCGGATACGGCCAAC 2160
GCCAAAGTGATTTTTTAACAATGGCAGCGCCCAAGTGCCCGGACAGAACCAGCCGGCTTT 2220
GATTATGTGAAGAATGGTTTGTATAACAATTCTGGTTTGAATGGCTATCTTCGGCATTA 2280
```

Secuencia de aminoácidos de AmiJ33

MF EKRFKTSLLPLVAGFLLLFHLVLSGPAAANAETADKSNEVTASSVKS GTILHAWNWSFNTLTQNMKD
IRDAGYAAIQTSPI NQVKEGNQGDKSMRNWYWLYQPTSYQIGNRYLGTEQEFKDMCAA AEKYGVKVI VD
AVINH TTSDYSAISDEIKRIPNWTHGNTQIKNWS DRWDVTQNSLLGLYDWNTQNT EVQTYLKRFLER AL
NDGADGFRYDAAKHIELPDDGNYGSRFWPNITNTAAEFQYGEILQDSASRDTAYANYMNV TASNYGH SI
RSALKNRNLSVSNISHYASDV SADKLVTWVESHDTYANDEEEESTWMSDDDIRLGWAVIGSRSGSTPLFF
SRPEGGGNGVRFP GKSQIGDRGSALFKDQAITAVNIFHNVMGGQPEELSNPNNGNNQIFMNQRGSKGVVL
ANAGSSAVAVNTSTKLPDGRYDN RAGIGSFQVTNGKLTGTINARSVAVLYPDDIGNAPHVFLENYQTGA
VHSFNDQLTVTLRANAKTTKAVYQINNGQQTGFKDGDRLTIGKGDPIGTAYDIKLTGTNSEGAARTQEY
TFVKKDPSQANIIGYQNP DHWGQVNAYIYKHDGGRAIELTGSWPGKAMTKNADGIYTLTLPENADTANA
KVIFNNGSAQVPGQNQPGFDYVKNGLYNNSGLNGYLRH-

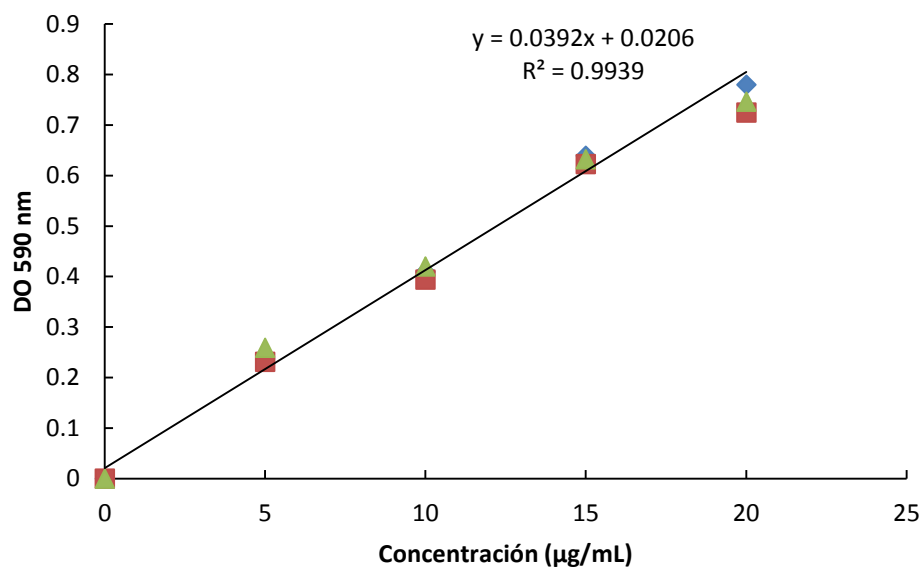
ANEXO III. CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA Y BSA

Curva patrón de glucosa



Curva de calibración de glucosa, DNS (Miller, 1959)

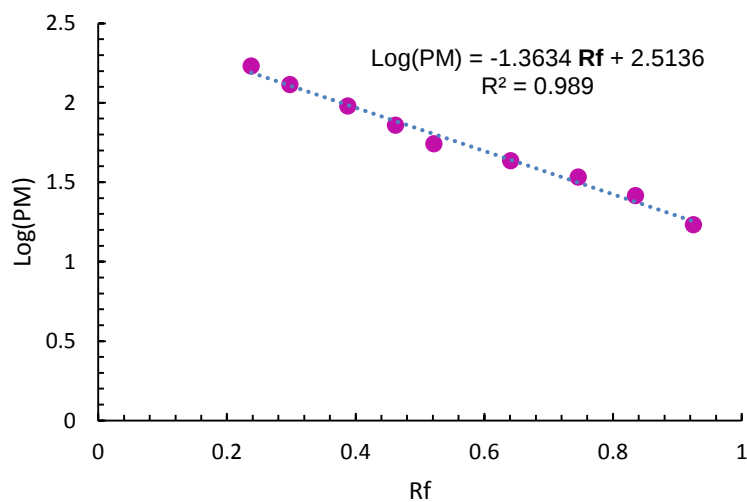
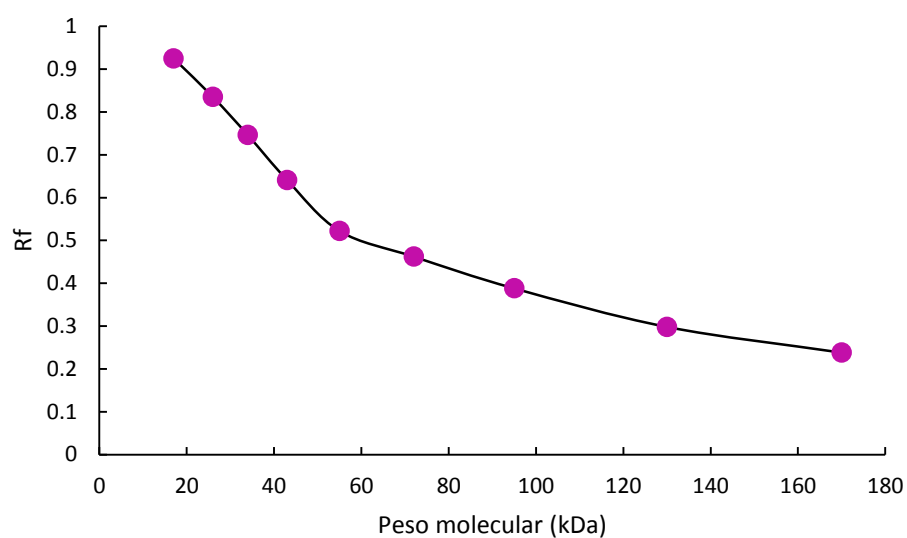
Curva patrón de BSA



Curva patrón de BSA (Bradford, 1976)

ANEXO IV. CURVA DE LINEALIZACION PARA LA OBTENCIÓN DE PM

Curva PM vs Rf



PM (kDa)	Rf
170	0.238
130	0.298
95	0.388
72	0.462
55	0.522
43	0.641
34	0.746
26	0.835
17	0.925
AmiJ33	0.597

Curva de linealización para la obtención de PM y tabla de pesos moleculares, movilidad relativa.

ANEXO V. TABLA DE ANOVA

Parámetros evaluados con el programa OriginLab 9.0

Tabla 7. Parámetros cinéticos evaluados con el programa OriginLab 9.0

	Valor	Error estandar	Coefficiente de correlación
$V_{\max}$	41.03225	6.72916	0.95522
K_m	10.66019	3.12168	

Tabla 8. Tabla de ANOVA

	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F_{CAL}</i>	<i>Prob>F</i>
Regresión	2	2986.98672	1493.49336	579.57592	7.25238E-11
Residual	11	28.3456	2.57687		
Error	13	3015.33232			
Total	12	690.54572			



ENMEX

BOLETÍN TÉCNICO

L I C U A M I L

ALFA AMILASA BACTERIANA PARA LICUEFACCIÓN DEL ALMIDÓN

DESCRIPCIÓN

LICUAMIL es una alfa Amilasa Bacteriana grado alimenticio producida por *Bacillus subtilis* var. Esta enzima es una endoamilasa que hidroliza aleatoriamente los enlaces glucosídicos alfa-(1,4) del almidón gelatinizado. Como consecuencia, la viscosidad se reduce y se obtienen dextrinas solubles y pequeñas cantidades de glucosa y maltosa.

LICUAMIL presenta una estabilidad excepcional a la temperatura. **LICUAMIL** puede ser agregado a las lechadas de almidón a temperaturas menores a las de gelatinización y la licuefacción puede ocurrir durante el cocimiento, tanto a la temperatura de gelatinización o por arriba de ésta. De tal forma que con **LICUAMIL** se pueden manejar altos sólidos y se evita la necesidad de enfriar antes de que se adicione la enzima.

PROPIEDADES

	LICUAMIL 340	AMILASA GLUCANOHIDROLASA
Aspecto	Líquido no viscoso	Líquido no viscoso
Color	De ambar a café	De ambar a café
Actividad	340,000 MWU/g	70,000 MWU/g



ENMEX

ACTIVIDAD

Una Unidad Wohlgemuth Modificada es la cantidad de enzima que dextriniza un miligramo de almidón soluble a una dextrina de tamaño definido en 30 minutos bajo las condiciones de la prueba.

COFACTORES

LICUAMIL es una metaloproteína de calcio, por lo tanto, en presencia de cantidades suficientes de este ion, la enzima es muy resistente a la desnaturalización en condiciones extremas de pH y temperatura. Cuando se desea mejorar la estabilidad de la enzima a temperaturas mayores de 60°C, se debe agregar ion calcio en proporción de 200 a 400 ppm.

El Cloruro de Sodio a concentraciones de 2,000 - 5,000 ppm, también contribuye a mejorar la estabilidad.

EFFECTO DEL pH

LICUAMIL tiene un pH óptimo de 6.0 a 40 °C en presencia de 2% de almidón soluble (fig. 1). En presencia de 10 a 50 % de almidón soluble y suficiente ion calcio, la enzima demuestra óptima hidrólisis en un rango de pH de 6 a 7 a 70 °C, y pH de 6.5 a 7.5 por arriba de 70 °C. **LICUAMIL** puede hidrolizar efectivamente el almidón en un rango de pH de 5 a 7.5 a 70 °C, aunque la velocidad de hidrólisis se ve disminuida en los extremos (fig. 2). **LICUAMIL** es estable en solución a 70 °C en un rango de pH de 5.0 a 10.0 (fig. 3).

pH óptimo (Fig. 1)	6.0 - 7.0
Rango efectivo de pH (Fig. 2)	5.0 - 7.5
Rango de estabilidad de pH (Fig. 3)	5.0 -10.0



ENMEX

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

LICUAMIL tiene una temperatura óptima de 70 °C a un pH de 6.0 (fig. 4). En presencia de 10 a 50 % de almidón soluble y suficiente ion calcio, la enzima demuestra excelente termoestabilidad e hidrólisis efectiva hasta una temperatura de 90 °C. En un rango de temperatura de 60 a 70 °C a un pH de 6.5 a 7.5 la enzima tiene estabilidad prolongada. A temperaturas más altas (70 - 85 °C) la velocidad de hidrólisis es acelerada pero también hay un incremento en la velocidad de inactivación de la enzima.

Temperatura óptima (Fig. 4)	70 °C
Rango óptimo de temperatura	65 °C - 75 °C
Rango efectivo de temperatura	Hasta 90 °C

INACTIVACIÓN

LICUAMIL se puede inactivar térmicamente elevando la temperatura a 90 - 100 °C y manteniéndola por espacio de 10 a 20 minutos. Es necesario hacer notar que como resultado del aumento de la temperatura, la enzima muestra una actividad elevada antes de completar la inactivación.

Cuando la inactivación térmica es indeseable se puede lograr este efecto, reduciendo el pH fuera del rango de estabilidad por medio de ácido sulfúrico o clorhídrico. A pH 5 y 90 °C la inactivación se logra en 15 minutos aproximadamente, o a pH 3.5 - 4.0 y temperatura de 80 a 85 °C, tomará 15 minutos aproximadamente. Después de la inactivación, la lechada de almidón deberá ser neutralizada con carbonato de sodio o carbonato de calcio.

Químicamente se puede inactivar agregando 4% de cloro en forma de hipoclorito de sodio. Para usos no alimenticios, usar 0.5% de sulfato de cobre en base seca.