



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE AMILASAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DE
SUELOS CULTIVADOS CON CAÑA DE AZÚCAR**

TESIS

Que para obtener el grado de:
Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Juan José Montor Antonio

Directora:

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura

Co-Directora:

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., mayo de 2013

Este trabajo se realizó en la **Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec**, bajo la dirección de la **Dra. Sandra T. del Moral Ventura** y de la **Dra. Laura P. Ramírez Coutiño**, con apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), a través del proyecto PROMEP 2009-02 103.5/11/6149, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto CONACYT 154683.

DEDICATORIA

A mi madre, **Crisófora Antonio Hernández**, por el sacrificio y esfuerzo conjunto que hicimos para lograr esto.

A mis hermanos **Karla Itzel** y **Cristhian David**, para demostrarles que si se quiere, se puede.

A mi tío, el **Lic. Jorge B. Morales Antonio**, porque la promesa que hice en mi niñez de superarlo sigue en pie.

A mi abuelo, **Francisco Montor Servin** y a mi padre, **Juan José Montor Hilario**, por enseñarme el dolor del trabajo para que deseara mil veces mejor estudiar.

A **Susy López Vicente**, por ser mi amiga, mi compañera, mi novia, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Te Amo “chilpalla”.

A la **Sra. Andrea Vicente Merino** y al **Sr. Elías López García**, por tenderme la mano, por ser comprensibles, amables y unos buenos suegros, los aprecio mucho.

A **ÉL**, por darme lecciones en los momentos indicados.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Sandra T. del Moral Ventura**, por su paciencia durante los primeros semestres de trabajo, por darme la confianza y responsabilidad sobre el equipo y material del laboratorio, por su accesibilidad, apoyo y enseñanzas brindadas.

A la **Dra. Laura P. Ramírez Coutiño**, por su amabilidad, comprensión, apoyo e interés en la conclusión del presente trabajo.

Al **Dr. Bernardo Sachman Ruiz**, por su tiempo invertido en la elaboración del filograma.

A la jefa de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, la **Dra. Ana Karín Navarro Martínez**, y a todos los profesores de esta universidad que me brindaron sus conocimientos para formarme académicamente.

A mi amigo **José Francisco Pulido Barajas**, por su ayuda para tener la computadora siempre al ciento por ciento.

A todos los que iniciaron pero que no terminaron.

“No, this is not the end, but this is not even the beginning, of the end. Or rather it's perhaps, the end of the beginning”

“No, este no es el fin, no es siquiera el principio del fin. Puede ser, más bien, el fin del principio”

Winston Churchil

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACIONES	11
RESUMEN.....	12
SUMMARY	14
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I	16
1.1 Tipos de amilasas.....	16
1.1.1 α -amilasas	21
1.1.2 β -amilasas	23
1.1.3 Glucan α -(1-4)-glucosidasas.....	24
1.1.4 Isoamilasas	25
1.1.5 Pululanasa	27
1.2 Usos de amilasas.....	29
1.3 Fuentes de obtención y propiedades bioquímicas de las amilasas	30
1.3.1 Efecto de iones metálicos y quelantes en la actividad y estabilidad estructural de α -amilasas.....	32
1.4 Fuentes potenciales de microorganismos productores de amilasas.....	35
1.4.1 Suelos	35
1.4.2 Características de la Cuenca del Papaloapan y de sus suelos.....	37
CAPÍTULO II.....	38
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	38
2.3 HIPÓTESIS	38
2.4 OBJETIVOS.....	39

2.4.1 Objetivo general	39
2.4.2 Objetivos particulares	39
2.5 METAS.....	39
CAPÍTULO III	40
3.1 METODOLOGÍA.....	40
3.1.1 Toma de muestra de suelos.....	40
3.1.2 Aislamiento de bacterias productoras de amilasas	40
3.1.3 Escrutinio de actividad amilasa de los aislados bacterianos.....	41
3.1.4 Selección de aislados bacterianos con mayor actividad enzimática.....	41
3.1.5 Caracterización bioquímica y molecular de los aislados bacterianos.....	42
3.1.6 Selección de fuentes de nitrógeno para incrementar la producción de amilasas.....	44
3.1.7 Precipitación de AmiJ33 con sulfato de amonio	46
3.1.8 Cuantificación de proteína extracelular total.....	46
3.1.9 Determinación de la actividad amilasa.....	47
3.1.10 Electroforesis de proteínas.....	47
3.1.11 Tinción de proteínas con azul de Coomassie.....	47
3.1.12 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad amilasa	48
CAPÍTULO IV	49
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1.2 Aislamiento de cepas bacterianas con actividad amilasa	49
4.1.3 Caracterización bioquímica y molecular de los aislados bacterianos seleccionados	52
4.1.4 Selección de la fuente de nitrógeno para incrementar la producción de amilasas ..	57
4.1.5 Curva de crecimiento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M	61
4.1.6 Obtención de AmiJ33	64
4.1.6.1 Precipitación con sulfato de amonio de AmiJ33	64
4.1.7 Caracterización enzimática parcial de AmiJ33	65
4.1.7.1 Efecto del pH y la temperatura en la actividad de AmiJ33	65
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	69

REFERENCIAS	70
ANEXOS	81
I. Secuencias del gen 16S.....	81
II. Estructuras de los sustratos y productos de las amilasas	83
III. Curvas de calibración.....	84
IV. Tabla de características morfométricas de los suelos	85
V. Prueba de medias de Tukey	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de amilasas.....	17
Tabla 2. Peso molecular de α -amilasas y los microorganismos productores	23
Tabla 3. Características bioquímicas de α -amilasas producidas por microorganismos	31
Tabla 4. Efecto de agentes quelantes e inhibidores sobre la actividad α -amilasa	33
Tabla 5. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad α -amilasa.....	34
Tabla 6. Clasificación de los suelos según la SSS y la FAO/UNESCO.....	36
Tabla 7. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S.....	42
Tabla 8. Componentes de PCR para amplificar el gen 16S.....	43
Tabla 9. Componentes del medio de cultivo seleccionado.....	44
Tabla 10. Características morfológicas macroscópicas de los aislados bacterianos	51
Tabla 11. Sustratos metabolizables por los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N (galería API 20A)	53
Tabla 12. Sustratos metabolizables por el aislado bacteriano JJC32 (galería API 20E)	54
Tabla 13. Primera etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilasa	58
Tabla 14. Segunda etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad α -amilasa.....	59
Tabla 15. Tercera y cuarta etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad α -amilasa	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Sitios de hidrólisis de cinco tipos de amilasas sobre un polisacárido	17
Fig. 2. Residuos catalíticos de la α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	19
Fig. 3. Mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración α	20
Fig. 4. Mecanismo de inversión de β -amilasas y glucan α -(1-4) glucosidasas	21
Fig. 5. Estructura 3D de α -amilasa de <i>Bacillus sp.</i> KSM-K38 dependiente del ión sodio ..	22
Fig. 6. Estructura 3D de la β -amilasa de <i>Bacillus cereus</i>	24
Fig. 7. Estructura 3D de la glucan α -(1-4)- glucosidasa de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> .	25
Fig. 8. Estructura 3D de la isoamilasa de <i>Pseudomonas spp</i>	26
Fig. 9. Sitios de hidrólisis de la pululanasa en un fragmento de polisacárido	28
Fig.10. Estructura 3D de la pululanasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Fig. 11. Esquema del procedimiento para evaluar la fuente de nitrógeno sobre la relación H:De	45
Fig. 12. Aislados bacterianos con actividad amilasa.....	50
Fig. 13. Morfología y tinción de Gram de los aislados bacterianos con actividad amilasa .	51
Fig. 14. Galerías API metabolizadas por los aislados bacterianos seleccionados.....	53
Fig. 15. Árbol filogenético de los aislados bacterianos JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N .	56
Fig. 16. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad α -amilasa.....	60
Fig. 17. Curva de crecimiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M y medición de azúcares reductores presentes en el medio	62, 63
Fig. 18. Proceso de producción y recuperación de AmiJ33	64
Fig. 19. Electroforesis de proteínas de la fracción proteica F60	65
Fig. 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33.....	66
Fig. 21. Efecto del pH sobre la actividad de AmiJ33.....	67

LISTA DE ABREVIACIONES

AmiJ33	α -amilasa de <i>Bacillus amyloliquefacies</i> JJC33M
Alm1%	Almidón al 1% (p/v)
Asp	Residuo de ácido aspártico
Ca²⁺	Ión calcio
EL	Extracto de levadura
G	Glicina
Glu	Residuo de ácido glutámico
H:Dc	Relación halo: diámetro de la colonia
ITS	Internal Transcribed Spacer/ Espaciador Interno del Transcrito
MM	Medio Mandel
MWCO	Molecular Weight Cutoff/ Corte de Peso Molecular
P	Peptona

RESUMEN

Las amilasas hidrolizan el enlace glucosídico α -(1-4) o α -(1-6) del almidón, glucógeno y otros polisacáridos. Se obtienen principalmente de fuentes microbianas y tienen múltiples aplicaciones en la industria, principalmente en la alimentaria. Estructuralmente las amilasas son enzimas compuestas por tres dominios y su peso molecular varía entre 10 y 210kDa, pertenecen a familia de las glucosilasas y se dividen en clanes, de los cuales el más importante es el clan GH-H o clan de las α -amilasas. *Bacillus amyloliquefaciens* produce una α -amilasa termoestable que es ampliamente utilizada en las industrias que usan almidón. En el presente trabajo, a partir de suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Cuenca del Papaloapan, se aislaron cuatro cepas productoras de amilasas, de las cuales tres están relacionadas con *Bacillus amyloliquefaciens*. La α -amilasa de la cepa nombrada *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) fue recuperada mediante precipitación con sales y su peso molecular calculado fue de aproximadamente 50kDa. Así mismo, 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. AmiJ33 conservó el 72% de la actividad a pH 4.0 y 5.0. A partir de estos resultados, es posible proponer a AmiJ33 para su uso en industrias de panificación o de textiles, sin embargo, es necesario realizar estudios de termoestabilidad y conocer los parámetros cinéticos de la enzima para tener información suficiente que permita proponerla a otros sectores industriales, o bien, que amplie el conocimiento para mejorar su uso en las industrias ya propuestas.

SUMMARY

Amylases hydrolyze glycosidic bonds α -(1-4) or α -(1-6) of starch, glycogen and other polysaccharides. They are primarily derived from microbial sources, and have several applications in industry, mainly in the food industry. Amylases are enzymes structurally composed of three domains and their molecular weights varies between 10 and 210kDa. Also amylases belong to the family of glucosidases and divided into clans, of which the most important is the GH-H clan or α -amylase clan. *Bacillus amyloliquefaciens* produces an α -amylase thermostable that is used in starch industries. In this work, four amylase producing strains were isolated, from soil cultivated with sugarcane in the Papaloapan region, and three were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Amylase of strain named *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) was recovered by precipitation with salts and its molecular weight was determined around 50kDa. Likewise, effect of pH and temperature were evaluated on enzyme activity, the highest value of activity was observed at pH 6.0 and 80°C. AmiJ33 retained 72% of the activity at pH 4.0 y 5.0. From these results, it is possible to propose AmiJ33 for use in bakery and textiles industries. However, studies to understand the thermal stability and kinetic parameters of the enzyme are to increase the knowledge in order to improve its implementation in the proposed industries.

INTRODUCCIÓN

Desde que se industrializó la producción de amilasas a partir de *Aspergillus oryzae* en 1894 (Prasanna, 2005), diversas compañías como Valley Research/Diversa, Genencor y Novozymes (Turner y col., 2007) se han dedicado a la producción y comercialización de este tipo de enzimas a partir de diversas fuentes microbianas. Las amilasas son enzimas intra o extracelulares que promueven la hidrólisis de enlaces glucosídicos presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos (Van der Maarel y col., 2002), por lo que la aplicación de estas enzimas es muy variada. Entre sus principales aplicaciones se encuentran: su uso en el mejoramiento de harinas para la industria panadera, liberación de azúcares a partir de malta en la industria cervecera, para desalmidonar telas en la industria textil y como aditivos en detergentes (Prasanna, 2005). Las ventas globales de amilasas tan solo en el año 2010 se estimaron en \$480 millones de dólares (cienciacierta.uadec.mx), cifra equivalente al 30% del mercado mundial de enzimas e indicativa de la gran demanda de amilasas (Kilara y col., 1996; Pandey y col., 2000; Bertoldo y Antranikian, 2002). Las amilasas son producidas por animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, los rendimientos de amilasas de plantas y animales son muy bajos, además su recuperación implica pasos adicionales de bioseparación, ya que generalmente estas enzimas son intracelulares, por lo que para satisfacer la demanda mundial se requerirían de grandes cantidades de materia prima. Por ello, las mejores fuentes productoras de amilasas son bacterias y hongos, no solo porque sus amilasas son generalmente extracelulares, sino que además presentan altos niveles de expresión (Pandey y col., 2000). En este sentido, los principales microorganismos productores de amilasas son *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *Aspergillus sp.* (Vihinen y Mantsala, 1989, Pandey y col., 2000). De acuerdo a la literatura, estos microorganismos han sido aislados principalmente de residuos agroindustriales (Ramachandra y col., 2004; Francis y col., 2002), semillas en descomposición (Boyer y Shannon, 1987), compostas y suelos (Quintero y col., 2009; Devi y col., 2010).

Algunos reportes indican que puede haber hasta 7×10^9 millones de microorganismos/gramo de suelo (Alexander, 1977), lo que constituye una de las fuentes con mayor densidad

microbiana ideal para aislar microorganismos productores de enzimas. Es por ello que el suelo parece ser el mejor nicho para encontrar fuentes microbianas productoras de amilasas.

En este trabajo se describe el proceso de aislamiento de bacterias productoras de amilasas a partir de suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Cuenca del Papaloapan, así como la identificación taxonómica de las bacterias aisladas utilizando diversas herramientas y el procedimiento para aumentar la producción de sus amilasas. Asimismo, se realizó una caracterización enzimática parcial de la amilasa seleccionada, evaluando el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.

CAPÍTULO I

1.1 Tipos de amilasas

Las amilasas, al igual que todas las enzimas conocidas, se clasifican mediante un código de cuatro números (EC W.X.Y.X) de acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC, por sus siglas en inglés), los cuales indican:

- W: tipo de reacción catalizada (1 a 6)
- X: sustrato general o grupo implicado
- Y: sustrato específico o coenzima
- Z: número de serie

Por lo que las enzimas con código EC 3.2.1, como las amilasas, son aquellas que hidrolizan enlaces *O*- o *S*-glucosídicos (www.genome.jp). Asimismo se clasifican como endo y exo amilasas, de acuerdo al sitio de hidrólisis que efectúan sobre la molécula de almidón, glucógeno y otros polisacáridos (fig. 1). Se pueden identificar como endo amilasas a la α -amilasa (EC 3.2.1.1), la pululanasa (EC 3.2.1.41), la glucan 1,4- α -maltohidrolasa (EC 3.2.1.133) y a la isoamilasa (EC 3.2.1.68), y como exo amilasas a la glucan α -(1-4)-glucosidasa (EC 3.2.1.3), la β -amilasa (EC 3.2.1.2), la dextran α -(1-6)- isomaltotriosidasa (EC 3.2.1.95), la glucan α -(1-4)- maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60), y las glucan α -(1-4)-maltohexaosidasa (EC 3.2.1.98) (Nonaka y col., 2003) (tabla 1).

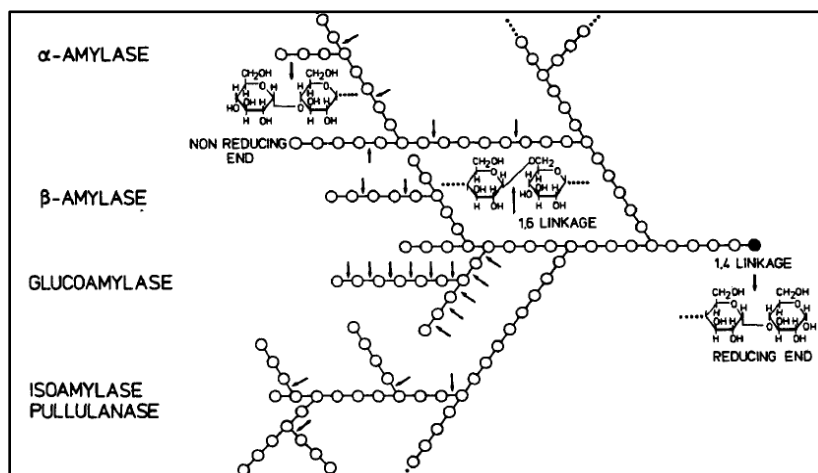


Fig. 1. Sitios de hidrólisis de cinco tipos de amilasas sobre un polisacárido. Los círculos representan unidades de glucosa. Tomado de Vihinen y Mantsala 1989.

Tabla1. Tipos de amilasas

Enzima	Otros nombres	E.C.	Reacción	Referencias
α -amilasa	Taka-amilasa A endoamilasa glucogenasa α -(1-4)- D-glucan glucanohidrolasa	3.2.1.1	Endohidrólisis de enlaces α - (1-4)- D-glucosídicos en polisacáridos que contienen tres o más enlaces α - (1-4)- D-glucosídicos	Fischer y Stein, 1960; Manners, 1962; Schwimmer y Balls, 1949
Pululanasa	α -dextrin endo-(1-6)- α -glucosidasa Amilopectin 6-glucanohidrolasa Enzima desramadora Dextrinasa límite Pululano 6-glucanohidrolasa	3.2.1.41	Hidrólisis de enlaces α -(1-6)-D-glucosídicos en pululano, amilopectina y glicógeno, y en α - y β -dextrinas límite de amilopectina y glicógeno	www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.2.1.41
glucan 1,4- α -maltohidrolasa	α -amilasa maltogénica α -(1-4)- D-glucan α -maltohidrolasa	3.2.1.133	Hidrólisis de enlaces α - (1-4)- D-glucosídicos en polisacáridos. Liberación de residuos de α -maltosa del extremo terminal no reductor	Diderichsen y Christiansen, 1988
Isoamilasa	Enzima desramadora	3.2.1.68	Hidrólisis de enlaces α -(1-6)- D-glucosídicos en glicógeno, amilopectina y otras β -dextrinas límite	www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.2.1.68
	γ -1,4-glucan glucanohidrolasa γ -amilasa			

glucan α -(1-4)-glucosidasa	maltasa ácida amiloglucosidasa α -glucosidasa α -(1-4)-exo-glucosidasa glucoamilasa α -glucosidasa lisosomal α -(1-4)-D-glucan glucosidasa	3.2.1.3	Hidrólisis de enlaces α -(1-4)-D-glucosídicos terminales del extremo terminal no reductor con liberación de β -D-glucosa	Kelly y Alpers, 1973
β -amilasa	glucogenasa amilasa sacarogénica α -(1-4)-D-glucan maltosidasa	3.2.1.2	Hidrólisis de enlaces α -(1-4)-D-glucosídicos en polisacáridos, remueve unidades sucesivas de maltosa del extremo terminal no reductor	Balls y col., 1948; French, 1960 y Manners, 1962
Dextran α -(1-6)-isomaltotriosidasa	exo-isomaltotriohidrolasa	3.2.1.95	Hidrólisis de enlaces α -(1-6)-D-glucosídicos en dextranos, remueve unidades de isomaltotriosas del extremo terminal no reductor de polisacáridos	www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.2.1.95
glucan α -(1,4)-maltotetraohidrolasa	exo-maltotetraohidrolasa glucan α -(1-4) maltotetrahidrolasa G4-amilasa amilasa formadora de maltotetraosa α -(1-4)-D-glucan maltotetraohidrolasa	3.2.1.60	Hidrólisis de enlaces α -(1-4)-D-glucosídicos en polisacáridos, remueve sucesivamente residuos de maltotetraosa del extremo terminal no reductor	Nakakuki y col., 1984 Robyt y col., 1971
glucan α -(1-4)-maltohexaosidasa	exo-maltohexaohidrolasa productora de maltohexaosa amilasa G6 α -(1-4)-D-glucan maltohexaohidrolasa	3.2.1.98	Hidrólisis de enlaces α -(1-4)-D-glucosídicos en polisacáridos, remoción de residuos de maltohexaosa del extremo terminal no reductor	Kainuma y col., 1975
Dextrinasa límite	Amilopectin-1,6-glucosidasa Enzima- R	3.2.1.142	Hidrólisis de enlaces α -(1-6)-D-glucosídicos en α y β -dextrinas límites de amilopectina y glucógeno, y en amilopectina y pululano	www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl

Todas las amilasas tienen en común la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -(1-4) o α -(1-6), produciendo unidades α -anoméricas u oligosacáridos, además poseen una estructura formada por ocho α hélices y ocho hojas β que se disponen en forma circular, a este plegamiento se le conoce como barril $(\alpha/\beta)_8$ o TIM barrel debido a que fue observado por

primera vez en la triosa fosfato isomerasa (TIM o TPI por sus siglas en inglés) (Nonaka y col., 2003). El plegamiento que se conoce como TIM barrel está fuertemente conservado en todas las amilasas microbianas. Dentro del túnel que forma el TIM barrel se localizan dos residuos de ácido aspártico (Asp) y un residuo de ácido glutámico (Glu) que son responsables de la actividad amilolítica (fig. 2) (Prasanna, 2005).

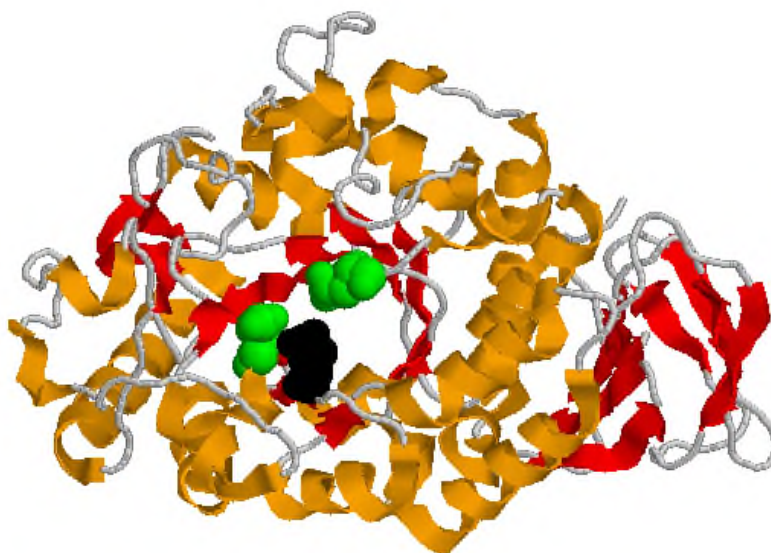


Fig. 2. Residuos catalíticos de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*: resaltados en verde los residuos de ácido aspártico (Asp-206 y Asp-297) y en negro el residuo de ácido glutámico (Glu-230) (Nielsen, y Borchert, 2000). Modificado de Protein Data Bank (PDB 6taa).

En la mayoría de las amilasas, el mecanismo catalítico consiste en un doble desplazamiento con retención de la configuración α (Van der Maarel et al., 2002). Durante este proceso, uno de los residuos de Asp realiza un ataque nucleofílico, al carbono anomérico (carbono α) del sustrato, formándose de manera transitoria un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Posteriormente, el residuo de Glu, actúa como ácido/base, y sustrae un protón de una molécula de agua que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Polaina, 2004), liberándose así la molécula hidrolizada (fig. 3).

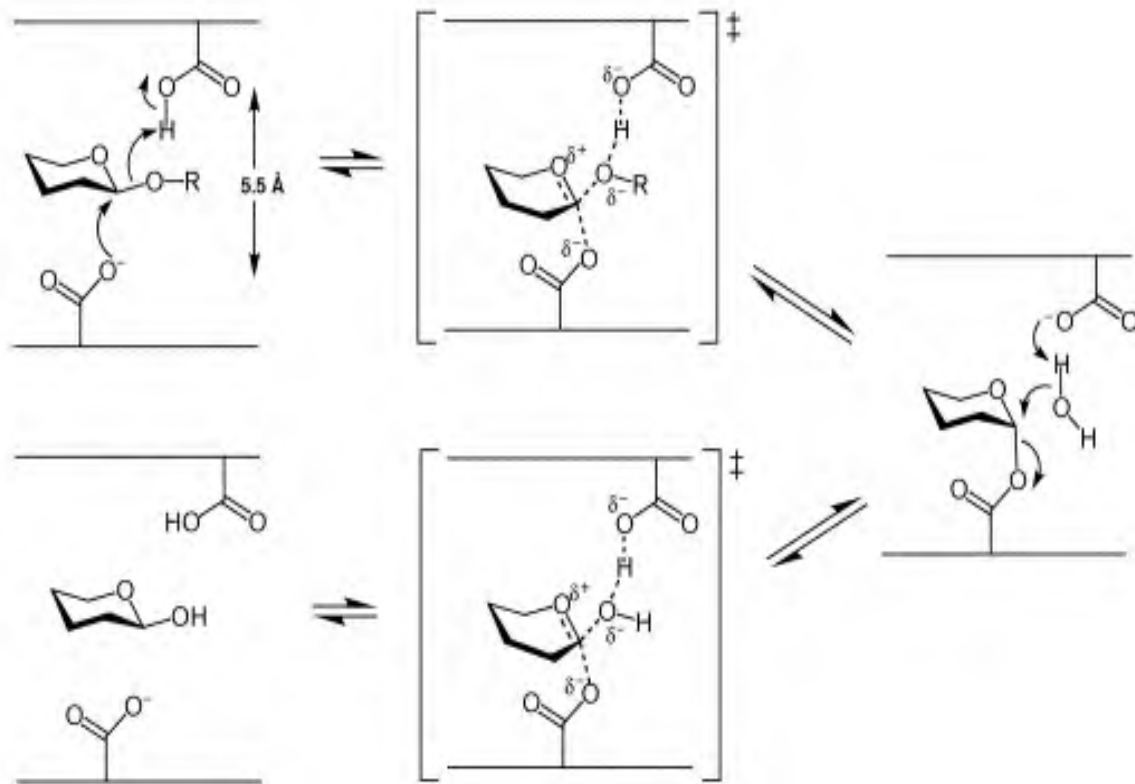


Fig. 3. Mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración α . Tomado de Polaina, 2004.

En las β -amilasas y las glucan α -(1-4)- glucosidasas, a diferencia del resto de las amilasas, los residuos responsables de la actividad son dos Glu (Mikami y col., 1994), por lo que no hidrolizan los sustratos mediante un mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración α , sino que emplean un mecanismo de inversión, por lo que el producto liberado adquiere una configuración β (Horváthová y col., 2001). El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido/base que involucra los dos residuos de Glu. 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 grupo acetal (Polaina, 2004) (fig. 4).

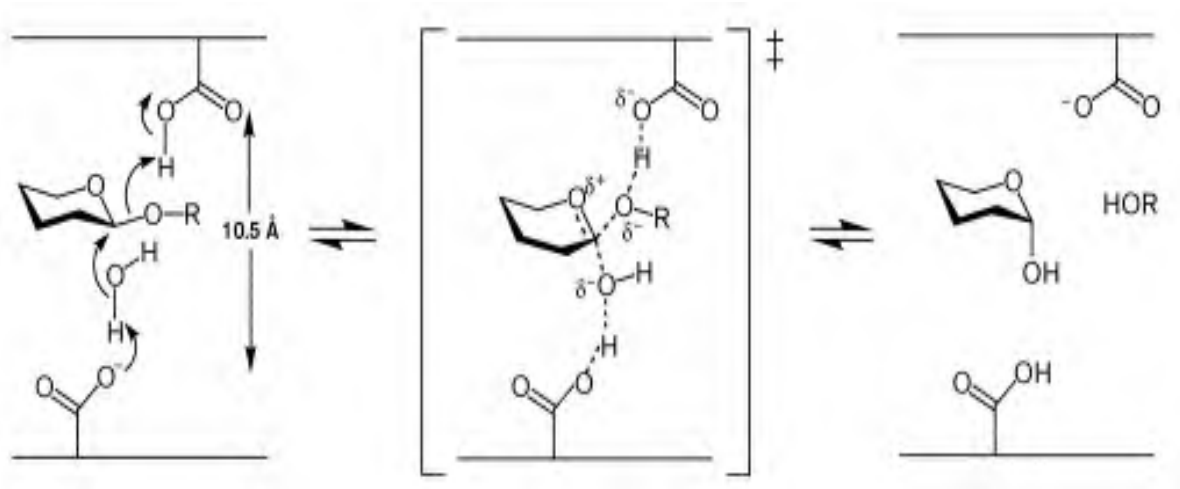


Fig. 4. Mecanismo de inversión en β -amilasas y glucan α -(1-4)- glucosidasas. Tomado de Polaina, 2004.

De las amilasas enlistadas en la tabla 1, las más importantes a nivel industrial son las α -amilasas, las β -amilasas, las glucan α -(1-4)- glucosidasas, las isoamilasas (Rani y Nanda, 1996) y las pululanasas (Vihinen y Mantsala, 1989).

1.1.1 α -amilasas

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1), son enzimas extracelulares denominadas endoenzimas porque catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos internos α -(1-4) presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos, asimismo hidrolizan enlaces glucosídicos α -(1-6) en un menor porcentaje que el α -(1-4) (Vihinen y Mantsala, 1989). Representan el tipo de amilasas más estudiado y se encuentran ampliamente distribuidas entre plantas, animales, bacterias y hongos, sin embargo debio a su gran demanda a nivel industrial son producidas a gran escala por los dos últimos organismos (Kilara y col., 2002).

Las α -amilasas están conformadas en tres dominios, un barril $(\alpha/\beta)_8$ (dominio A), un dominio adicional insertado en el dominio A (dominio B) que consiste en un “loop” largo que se destaca entre la hoja β_3 y la α hélice₃ y el dominio C-terminal (dominio C) con una hoja β unida al dominio A (fig. 4). El dominio A o TIM barrel contiene cuatro regiones altamente conservadas y estrechamente relacionadas al sitio activo en todas las α -amilasas (Kuriki y col., 2005). La primer región abarca el fin del C-terminal de la hoja β_3 y un

residuo de histidina que interactúa con los residuos de glucosa del sustrato, la segunda región contiene la hoja β_4 con un residuo de ácido aspártico, que actúa como nucleófilo durante la catálisis, la tercer región comprende la hoja β_5 y un residuo de ácido glutámico que actúa como el donador/aceptor de protones, la cuarta región consiste en una hoja β_7 , un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico que pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos de glucosa del sustrato (Sivaramakrishnan y col., 2006). La mayoría de las α -amilasas conocidas contienen Ca^{2+} que contribuyen a mantener su estabilidad estructural (Machius y col., 1998), aunque otras suelen estabilizarse con Na^+ (Nonaka y col., 2003) u otros iones.

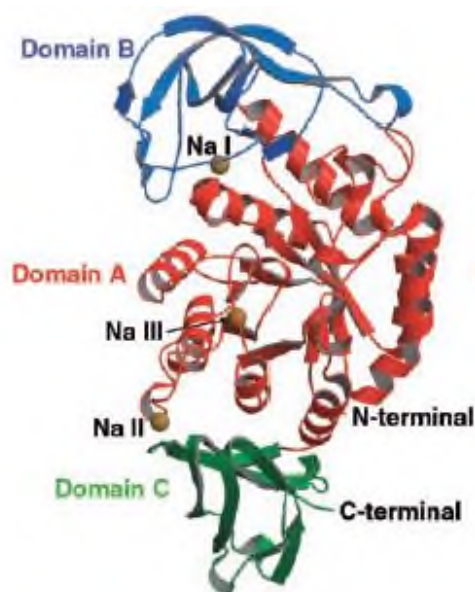


Fig. 5. Estructura 3D de α -amilasa de *Bacillus sp.* KSM-K38 dependiente del ión sodio (Na I, II y III). Se observan en azul el dominio A, en rojo el dominio B y en verde el dominio C. Tomado de Nonaka y col., 2003.

El peso molecular de las α -amilasas varía entre 10 y 139kDa (Vihinen y Mantsala, 1989). La α -amilasa más pequeña, hasta ahora conocida, la produce *Bacillus caldolyticus* y tiene un peso molecular de 10kDa (Grootegoed y col., 1973). Por lo general, el peso molecular de las α -amilasas bacterianas se encuentra entre 50 y 60kDa (tabla 2).

Tabla 2. Peso molecular de α -amilasas y los microorganismos productores

Microorganismo	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>B. licheniformis</i>	60	Raíces y col., 1992
<i>B. sp.</i> BBM1	77.6	Quintero y col., 2009
<i>Thermus sp.</i>	59	Shaw y col., 1995
<i>Bacillus sp.</i>	66	Aygan y col., 2008
<i>B. cereus</i> MS6	27	Abdu y col., 2011
<i>B. amyloliquefaciens</i>	58	Gangadharan y col., 2008
<i>B. sp.</i> BKL20	35	Kubrak y col., 20010

1.1.2 β -amilasas

Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) son enzimas intra y extracelulares clasificadas como exoenzimas debido a que hidrolizan los penúltimos enlaces glucosídicos α -(1-4) del extremo no reductor del almidón o de sustratos análogos (fig. 1) para producir β -maltosas y β -dextrinas límite (anexo III), estas últimas se forman porque las β -amilasas son incapaces de hidrolizar enlaces α -(1-6) (Vihinen y Mantsala, 1989). Los metales bivalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} (Takasaki, 1976) y Mn^{2+} (Ray y col., 1994; Obi y Odibo, 1984) aumentan significativamente la actividad de las β -amilasas. El peso molecular de las β -amilasas varía entre 31.6 y 160kDa (Vihinen y Mantsala, 1989). Las β -amilasas se encuentran muy distribuidas en el reino vegetal, por ejemplo en papa, semillas de centeno y soya (Rani y col., 1996), pero fue en 1974 que se descubrieron fuentes microbianas de esta enzima (Thomas y col., 1980; Nanmori, 1987).

La estructura del sitio catalítico de las β -amilasas, al igual que las α -amilasas, consiste en un TIM barrel (α/β)₈ (fig. 6), seguido por el “loop” de la región C-terminal, que aunque puede conferir estabilidad a toda la molécula de la β -amilasa, no está involucrado en la catálisis. El TIM barrel de las β -amilasas, es más similar al TIM barrel de las triosa fosfato isomerasas, que al TIM barrel de las α -amilasas (Mikami 2000).



Fig. 6. Estructura 3D de la β -amilasa de *Bacillus cereus*. Modificado de Protein Data Bank (PDB 1b90).

Al igual que las α -amilasas, las β -amilasas se emplean en procesos industriales que incluyen la producción de glucosa, licuefacción de almidón y procesamiento de harinas para pan (Fogarty y Kelly, 1980), y también se emplea como auxiliar digestivo en la industria farmacéutica. Su intervalo de temperatura óptima se encuentra entre los 28 y 60°C (Odibo y col., 1992) y el pH óptimo entre 3.5 y 7.0 (Gautam y col., 1991 y Kwan y col., 1994), dependiendo del microorganismo que la produzca. A pesar de la gran actividad de las β -amilasas bacterianas (Hirata y col., 2004), éstas son menos termoestables que las de las plantas (Siggins, 1987) por lo que solo son empleadas en los procesos industriales ya mencionados.

1.1.3 Glucan α -(1-4)-glucosidasas

Las glucan α -(1-4)-glucosidasas (EC 3.2.1.3) hidrolizan enlaces glucosídicos α -(1-4) ubicados en los extremos no reductores del almidón, glucógeno, dextrina y maltosa, además hidrolizan también enlaces glucosídicos α -(1-3), aunque más lentamente (Latorre, 2008). Las glucan α -(1-4)-glucosidasas de hongos son extracelulares, siendo estos los principales productores. En contraste, las glucan α -(1-4)-glucosidasas solo son producidas por unas cuantas bacterias, por ejemplo: *B. stearothermophilus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*,

y *Hulobacterium sodomense*, en las cuales la enzima suele estar unida a la membrana celular.

Las glucan α -(1-4)-glucosidasas adoptan un dominio catalítico helicoidal que consiste de doce α hélices, de las cuales seis forman un centro interno que se encuentra conectado a través de seis α hélices periféricas que son paralelas cada una de la otra pero antiparalelas a las α hélices del centro interno. Esta estructura se conoce como barril de plegamiento $(\alpha/\alpha)_6$ (fig. 7) y no es tan frecuente como el plegamiento TIM barrel (Pujadas y Palau, 1999).

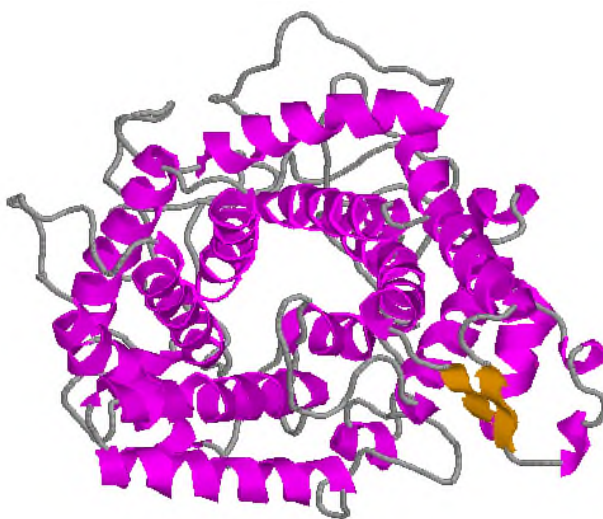


Fig. 7. Estructura 3D de la glucan α -(1-4)- glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera*. Modificado de Protein Data Bank (PDB 1ayx).

Los intervalos de pH y temperatura en los cuales las glucan α -(1-4)-glucosidasas realizan su actividad catalítica son de 3.0 a 5.5 y 40 a 65°C respectivamente, siendo el pH óptimo de 4.0 y la temperatura óptima de 58°C. Su peso molecular se ha estimado entre 12 y 160kDa. Algunos metales bivalentes como Ca^{2+} induce la enzima de *B. brevis* y otras moléculas como el inositol y la albúmina estabilizan la enzima de *Pseudomona fluorescens*.

1.1.4 Isoamilasas

Las isoamilasas (EC 3.2.1.68) son enzimas que pueden ser intra o extracelulares (Urlaub y Wober, 1975) y en algunos casos pueden estar unidas a la membrana celular, como la

isoamilasa de *Sacharomyces cerevisiae* (Jeanningrus y col., 1976). Las isoamilasas han sido encontradas en solo unas cuantas cepas bacterianas (Vihinen y Mantsala, 1989) (fig. 8). Hidrolizan enlaces glucosídicos α -(1-6) de amilopectinas, glucógeno, varias dextrinas y oligosacáridos, sin embargo, no pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos α -(1-6) de pululano, que son α -glucanos lineales que consisten en unidades de maltotriosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1-6), ni todos los enlaces α -(1-6) de β -dextrinas límite, probablemente por su baja afinidad a la cadena lateral acortada. Son usadas generalmente para producir glucosa, maltosa, maltitol, trehalosa y ciclodextrinas (Vihinen y Mantsala, 1989).

La estructura de las isoamilasas del género *Pseudomonas* consiste en un pseudo TIM barrel (α/β)₈ ya que, en comparación con el TIM barrel de otras amilasas, carece de una α hélice entre la quinta y sexta hoja β . Cuentan también con dos estructuras que no están presentes en el resto de las amilasas, la primera es un “loop” que está presente entre la tercer hoja β y la tercer α hélice, y se ubica en el dominio B, pero no puede considerarse como un dominio independiente porque forma un “cluster” globular junto con el “loop” que se ubica entre la cuarta hoja β y la cuarta α hélice, la segunda estructura es un dominio extra al que se le ha llamado dominio N y que se ubica en la región N-terminal. Las isoamilasas solo tienen un Ca^{2+} ligado y no se encuentra en la misma posición conservada que se ha reportado para otras amilasas (Katsuka y col., 1998).

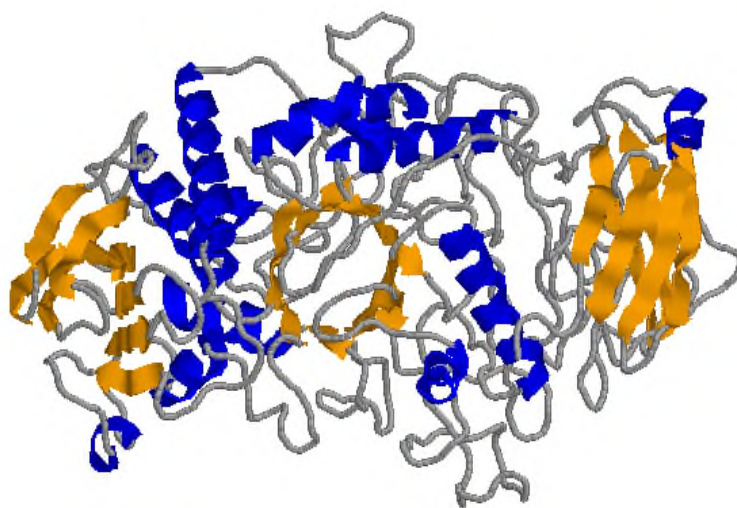


Fig. 8. Estructura 3D de la isoamilasa de *Pseudomonas* spp. Modificado de Protein Data Bank (PDB 1bf2).

La isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata* requiere por lo menos de tres residuos de glucosa en las cadenas ramificadas para realizar la hidrólisis (Kainuma y col., 1978). La isoamilasa de *E. coli* hidroliza completamente amilopectina (Jeanningrus y col., 1976). En general todas las isoamilasas tienen una temperatura óptima de entre 25 y 50°C, mientras su pH óptimo se encuentra entre 3.0 y 6.0 (Vihinen y Mantsala, 1989). El peso molecular de las isoamilasas es mayor al de las α y β -amilasas ubicándose entre los 65 y 121kDa. La isoamilasa de *P. amyloclavata* consiste en una sola cadena y tiene un peso molecular de 81kDa (Amemura y col., 1988).

1.1.5 Pululanastas

Las pululanastas (EC 3.2.1.41) son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos α -(1-6) o α -(1-4) del pululano y otros oligosacáridos ramificados, por lo que se han clasificado, de acuerdo a la especificidad de reconocimiento de dichos enlaces glucosídicos, en pululanastas tipo I y tipo II. Las pululanastas tipo I son las más ampliamente estudiadas, tienen la capacidad de hidrolizar eficientemente los enlaces glucosídicos α -(1-6) del pululano y polisacáridos ramificados. Las pululanastas tipo II, también llamadas amilopululanastas, son importantes en la industria de procesamiento de almidón debido a su capacidad de hidrolizar enlaces glucosídicos α -(1-6) y α -(1-4) (Rudiger y col., 1995). Las pululanastas pueden ser intracelulares, extracelulares o estar unidas a la membrana celular siendo la maltosa el azúcar más pequeño que puede liberar de un enlace α -(1-6) (www.ebi.ac.uk). Su actividad fue observada por primera vez en *Enterobacter aerogenes* (Vihinen y Mantsala, 1989). Las pululanastas hidrolizan la amilopectina completamente, pero tienen velocidad de reacción más lenta sobre dextrinas límite en comparación con las dextrinasas límite (EC 3.2.1.142) (www.ebi.ac.uk).

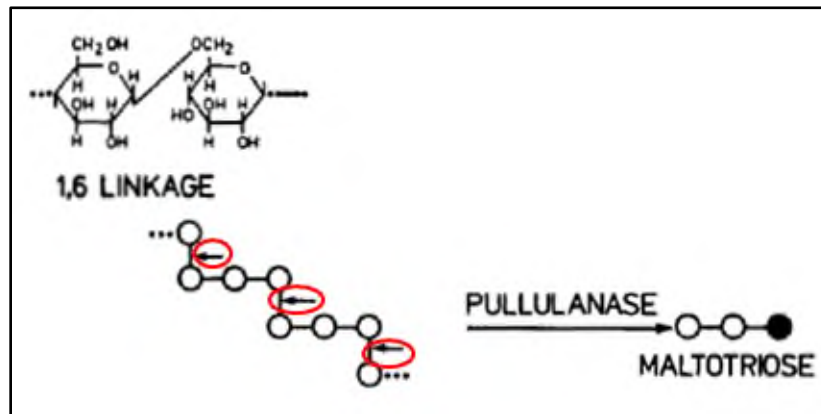


Fig.9. Sitios de hidrólisis de la pululanasa (señalados en rojo) en un fragmento de polisacárido. Los círculos representan unidades de glucosa, las líneas horizontales representan enlaces α - (1-4) y las líneas verticales representan enlaces α - (1-6). Tomado de Vihinen y Mantsala, 1989.

Clostridium thermohydrosulfiricum, *Thermus* sp. AMD-33 y *T. Brockii* son los únicos microorganismos conocidos que producen pululanosas termofílicas, aunque la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* es también termoestable (Vihinen y Mantsala, 1989). El Ca^{2+} favorece la actividad de la pululanasa de *K. pneumoniae* (fig. 10) y *Bacillus cereus* var. *mycoide*. Las actividades de las pululanosas difieren en presencia o ausencia de iones, por ejemplo la actividad de la pululanasa de *Sfrequentomyces* sp., se favorece en presencia de Ca^{2+} , mientras que la pululanasa de *B. macerans* NCIB 9368 soporta altas temperaturas en presencia de Na^+ .



Fig. 10. Estructura 3D de la pululanasa de *Klebsiella pneumoniae*. Modificado de Protein Data Bank (PDB 2fgz).

El intervalo de pH y temperatura para el uso de las pululanosas es de 4.0 a 6.5 y 40 a 65°C respectivamente, siendo el pH óptimo y la temperatura óptimos de 4.2 a 4.6 de 60°C respectivamente (www.enzymeinchina.es/9-pullulanase.html). La estructura de la pululanasa de *K. pneumoniae* (fig. 10) consiste en cinco dominios (N1, N2, N3, A y C). El dominio N1 y N2, son característicos de las pululanosas, mientras los dominios N3, A y C, son débilmente similares a los dominios de las isoamilasas producidas por el género *Pseudomonas*. Los residuos responsables de la actividad catalítica de la pululanasa de *K. pneumoniae* son Glu706 y Asp677, los cuales se encuentran muy conservados entre las pululanosas (Mikami y col., 2006). El peso molecular de las pululanosas varía de 80 a 145kDa (www.enzymeinchina.es/9-pullulanase.html).

1.2 Usos de amilasas

Debido al amplio intervalo de operación (temperatura y pH) de las amilasas microbianas, estas son altamente demandadas por la industria del almidón. Por ejemplo, México, país que alberga industrias cerveceras, textiles, panaderas, de químicos para la limpieza y farmacéuticas, en el 2010 importó 1,671 toneladas de amilasas de diversos países, con un costo total de \$ 192, 390, 582 (INEGI, 2010).

En el mercado existen diversas mezclas de amilasas (Bakezyme[®]P, Bakezyme[®]H, Bakezyme[®]PS/Bakezyme PFP, Bakezyme[®]AG) que permiten mejorar el sabor general y textura del pan, así como para retrasar su endurecimiento (retrogradación), también facilitan la manufactura del pan en sus diferentes presentaciones, por ejemplo hay productos específicos para masas con alto contenido de proteínas o fibra (www.lallemandmexico.com). Debido a que las glucan α -(1-4)-glucosidasas son menos estables a altas temperaturas, se suelen ocupar en las últimas etapas de procesos industriales, principalmente en la industria de panificación ya que forman edulcorantes (www.lallemandmexico.com) o para producir jarabes de glucosa y fructosa, o etanol a partir de la glucosa generada por la degradación de almidón.

La aplicación más importante de las β -amilasas es la obtención de jarabes de maltosa que son empleados por las industrias de alimentos y bebidas (Vihinen y Mantsala, 1989) o que pueden servir como reemplazo de glucosa para personas diabéticas (Yuen, 1974). Por otro lado, las α -amilasas producen, a partir de almidón de papa y maíz (Prasanna, 2005), jarabes de glucosa y glucosa cristalina, que puede ser fermentada para producir etanol, aminoácidos y ácidos orgánicos (Kirk y col., 2002), jarabes de fructosa a partir de maíz, jarabes de maltosa (Prasanna, 2005), para reducir la viscosidad de jarabes de azúcar, evitar la formación de grumos en los jugos, para la solubilización y sacarificación de almidón (Van Lenen y Smith, 1968). También las amilasas suelen usarse como agentes adelgazantes para disminuir la viscosidad del almidón gelatinizado, disminuyendo así la retrogradación del almidón durante el proceso de enfriamiento (Prasanna, 2005). Otro producto de las α -amilasas, β -amilasas y pululaninas son las mezclas de malto-oligómeros que se obtienen por la digestión de almidón de maíz. Su composición normalmente es: 2.2% de glucosa, 37.5% de maltosa, 46.4% de maltotriosa y 14% de maltotetraosa y maltooligosacáridos. Estos malto-oligómeros sirven como reguladores de humedad en los alimentos. Como son menos dulces que la sacarosa se utilizan como suplementos de ésta y otros sacáridos (Prasanna, 2005).

La industria de los detergentes es otro de los sectores que emplea amilasas como un aditivo para remover suciedades compuestas de almidón. En la industria textil se ocupan para desalmidonar las telas (Prasanna, 2005), y en la industria de alimentos para animales las utilizan para facilitar la digestión de los granos de sorgo, cebada o maíz en cerdos y pollos (Britton y Stock, 1986; Hungtington, 1997; Rojo y col., 2000).

1.3 Fuentes de obtención y propiedades bioquímicas de las amilasas

Como se ha visto, las α -amilasas son producidas por bacterias y hongos, sin embargo no todas comparten las mismas características bioquímicas o enzimáticas, esto se debe entre otras cosas, a las propiedades moleculares de la enzima, al tipo de microorganismo productor y al lugar de donde este último se aisló. Bacterias del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, (Vihinen y col.,

1989, Pandey y col., 2000), *B. velezensis*, *B. coagulans*, *B. stearotherophilus*, *B. acidocaldarius* y *Actinomycetes* incluyendo *Thermomonospora* y *Thermoactinomyces* son buenos productores de α -amilasas (Ben y col., 1999). También podemos obtener α -amilasas de hongos como *Aspergillus flavus* var. *columnaris* (El-Safey y Ammar, 2004), *Fusarium vasinfectum*, *F. oxysporum*, *Beauveria bassiana* (Flores y col., 2005), *Thermoactinomyces vulgaris* (Mizuno y col., 2004), *Saccharomycopsis hygroscopicus*, *S. fibuligera*, *Acinetobacter* sp., *Basidiomycetes*, *Aureobasidium pullulans*, *Aeromonas hydrophila*, *Dictyoglomus thermophila*, *Talaromyces emersonii*, *Streptomyces limosus*. Las α -amilasas de estos hongos, por lo general soportan condiciones más extremas de pH y temperatura debido a las características propias de la enzima, como consecuencia del grado de adaptación que presentan estos organismos en diferentes ecosistemas (Obi y Odibo, 1984). Como podemos observar, las características de las amilasas obtenidas a partir de microorganismos varían dependiendo del tipo de microorganismo productor. En la tabla 3 se muestran los intervalos de temperaturas y de pH de algunas α -amilasas microbianas.

Tabla 3. Características bioquímicas de α -amilasas producidas por microorganismos. Sivaramakrishnan y col., 2006.

Organismo	Intervalo de operación de temperatura (°C)	Temperatura óptima (°C)
<i>Bacillus</i> sp. I-3	65-100	70
<i>Pyrococcus furiosus</i>	80-100	100
<i>Thermobifida fusca</i> NTU22	50-60	60
<i>Cryptococcus flavus</i>	50-60	50
<i>Aspergillus tamari</i>	50-60	55
<i>Scytalidium thermophilum</i>	55-65	60
Organismo	Intervalo de operación de pH	pH óptimo
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	4.0–6.0	5.5
<i>Bacillus</i> sp. ANT-6	9.0–13	10.5
<i>Bacillus</i> KSM-K38	6.0–11.0	8.0–9.5
<i>Bacillus</i> sp. PS-7	5.0– 8.0	6.5
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	5.0–7.0	6.0
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	2.0–6.5	5.0

Aunque las α -amilasas tienen actividad en un intervalo amplio de temperatura y pH, es conocido que algunas amilasas termoestables se vuelven inestables a un pH menor a 6.0 (Crabb y Mitchinson, 1997). Debido a características como estas, se deben establecer los criterios más importantes para una reacción biocatalítica en la que se empleen α -amilasas,

es decir, si se prefiere una α -amilasa que sea termoestable y que soporte un pH alcalino sobre una que no sea termoestable y soporte un pH ácido, o bien combinar estas características según convenga. Otra opción es emplear una α -amilasa mutante que contenga todas las características deseables para la industria, sin embargo, la investigación para crear esta α -amilasa sería ardua y los costos de su venta se incrementarían.

1.3.1 Efecto de iones metálicos y quelantes en la actividad y estabilidad estructural de α -amilasas

Las α -amilasas también se analizan en presencia de agentes quelantes como EDTA y EGTA, o bien con agentes desnaturalizantes como SDS, urea o H_2O_2 , porque es importante saber bajo qué condiciones mantienen su actividad, información que es de relevancia para la industria. Cuando una α -amilasa se usa como aditivo de detergentes, es desfavorable que su rigidez estructural dependa de Ca^{2+} incluido en la molécula de α -amilasa porque los reactivos quelantes, normalmente contenidos en los detergentes, fácilmente remueven Ca^{2+} y Zn^{2+} (Nielsen y Borchert, 2000). Por ejemplo, la α -amilasa AmyK38 producida por *Bacillus sp.* KSM-K38 ha mostrado por medio de su actividad y su análisis elemental, que no tiene ningún Ca^{2+} y que no se inhibe por agentes quelantes, pero su actividad enzimática depende de la existencia de Na^+ . Estas características son ventajosas para el uso de la α -amilasa AmyK38 como un componente de detergentes (Nonaka y col., 2003). En la tabla 4, se enlistan algunos microorganismos productores de α -amilasas que son resistentes a quelantes e inhibidores.

Tabla 4. Efecto de agentes quelantes e inhibidores sobre la actividad α -amilasa. Sivaramakrishnan y col., 2006.

Agente quelante/inhibidor	Concentración y efecto	Organismo
EDTA	10 mM R	<i>Bacillus</i> sp. L1711
EDTA	10 mM I	<i>Bacillus</i> sp. I-3
EDTA	100 mM R	<i>Bacillus</i> KSM-K38
SDS	(1 %) L. I.	<i>B. halodurans</i> LBK 34
Urea	8 M I	<i>Bacillus</i> sp. ANT-6
H ₂ O ₂	1.8 M R	<i>Bacillus</i> KSM-K38
EGTA	1 mM I	<i>L. starkeyi</i>
EGTA	10 mM R	<i>Bacillus</i> sp. L1711

R: resistente, I: Inhibitoria, L. I: ligeramente inhibitoria.

La mayoría de las amilasas son dependientes de iones metálicos divalentes como Ca²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, o Cu²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺ o K⁺ (Pandey y col., 2000), Cr³⁺, Pb²⁺ y Cd²⁺ (Devi y col., 2010), los cuales pueden ejercer un efecto sobre la actividad (tabla 5). Es importante conocer cómo se puede elevar la actividad de la enzima para minimizar costos de producción, o bien en qué condiciones la enzima no mostrará actividad porque está siendo inhibida. El Ca²⁺ puede tener varias funciones, una de ellas está relacionada con la termoestabilidad y la actividad, por ejemplo, en la α -amilasa de *Bacillus* sp. ANT-6 incrementa la actividad (Burhan y col., 2003). Se sugiere que el efecto estabilizador del Ca²⁺ puede explicarse debido a la exclusión de los residuos hidrófobos por el Ca²⁺ en la proteína, lo que provoca la conformación de una estructura compacta y estable (Goyal y col., 2005). En otras enzimas, por ejemplo, en la α -amilasa de *Bacillus* sp. NP54 no se requiere de Ca²⁺ para su actividad o producción. El efecto de otros iones como el Zn²⁺ es variado sobre diferentes tipos de amilasas, por ejemplo, inhibe la α -amilasa termoestable de *Bacillus* sp. ANT-6. En cuanto a los iones bivalentes Ca²⁺, Ba²⁺ (Takasaki, 1976), Mn²⁺ (Ray y col., 1994) y Fe²⁺ (Obi y Odibo, 1984), aumentan la actividad de las β -amilasas. Se ha reportado que una concentración 5mM de Ca²⁺ proporciona termoestabilidad a la β -amilasa de *C. thermosulfurogenes*, mientras que el Mn²⁺ aumenta cuatro veces la

termoestabilidad de la β -amilasa de *B. megaterium* (Sheen y col., 1988). Otros agentes como el β -mercaptoetanol (β -ME), el ditioneitol (DTT), la L-cisteína y el glutati3n reducido (GSH) incrementan la actividad y estabilidad de las β -amilasas. El *p*-cloromercuribenzoato (pCMB) y la *n*-etil meleimida (NEM) son potenciadores de las β -amilasas de *C. thermosulfurogenes* (Hyun y Zeikus, 1985), *B. megaterium* B₆ (Ray y col., 1994), *B. megaterium* 32 (Higashihara y Okada, 1974) y *Thermoactinomyces* sp. V₄ (Beiyun y Youxia, 1991). Las α , β y γ -ciclodextrinas, tambi3n son fuertes inhibidores de varias β -amilasas microbianas y de plantas, sin embargo no afectan la actividad de la β -amilasa de *C. thermosulfurogenes* y *B. megaterium* (Sheen y col., 1988).

Tabla 5. Efecto de los iones met3licos sobre la actividad α -amilasa. Sivaramakrishnan y col., 2006.

Ion met3lico	Concentraci3n mM y efecto	Organismo
Ca ²⁺	5 P	<i>Bacillus</i> sp. ANT-6
K ⁺	10 P	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010
Na ⁺	5 P	<i>Bacillus</i> sp. L1711
	5 I	<i>Bacillus</i> sp. ANT-6
Co ²⁺	5 P	<i>Bacillus</i> sp. L1711
Mg ²⁺	5 P	<i>Vibrio</i> sp.
Ba ²⁺	10 P	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010
Mn ²⁺	1 P	<i>Bacillus</i> sp. I-3
	1 I	<i>Bacillus</i> KSM-K38
Zn ²⁺	10 P	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010
	5 I	<i>Bacillus</i> sp. ANT-6
Fe ²⁺	1 P	<i>Bacillus</i> sp. I-3
	20 I	<i>Cryptococcus flavus</i>
Cu ²⁺	1 P	<i>Bacillus</i> sp. I-3
	10 I	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010
Ni ²⁺	5 P	<i>B. halodurans</i> LBK 34
Al ³⁺	10 I	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010
Fe ³⁺	5 I	<i>B. halodurans</i> LBK 34
	1 I	<i>Bacillus</i> sp. I-3

P: promotora, I: inhibitoria.

La utilidad de las amilasas en el sector industrial es indudable, ya que proporcionan una forma limpia de conversi3n o eliminaci3n de pol3meros, principalmente almidones, adem3s tienen caracter3sticas bioqu3micas y enzim3ticas muy variadas, por lo que pueden ser a3nadas en cualquiera de las distintas etapas de los procesos industriales en las que son empleadas. La constante demanda de amilasas a nivel mundial ha conducido a la b3squeda de amilasas con caracter3sticas importantes para la industria, naturalmente existen especies

de microorganismos que producen amilasas alcalinas, psicrófilas, termófilas y resistentes a inhibidores y debido a que se han identificado los genes de varios tipos de amilasas, estas pueden ser producidas en grandes cantidades por microorganismos recombinantes. Como se ha mencionado en este trabajo, los microorganismos productores de amilasas son muy variados por lo que pueden encontrarse en cualquier parte del mundo, lo cual hace interesante estudiar y comparar las características enzimáticas, por ejemplo de una cepa de *B. amyloliquefaciens* hallada en Rusia con una cepa de *B. amyloliquefaciens* hallada en México, con el fin de conocer las condiciones bajo las cuales producen óptimamente la enzima y proponerlas para su aplicación en la industria textil, de alimentos (panificación y cervecería), de químicos para la limpieza (detergentes) o farmacéutica.

1.4 Fuentes potenciales de microorganismos productores de amilasas

Diversos microorganismos productores de amilasas han sido aislados de nichos como frutos y tubérculos en descomposición (Díaz y col., 2003), sedimentos marinos (Ballschmiter y col., 2006), suelos (Devi y col., 2010) y desechos agroindustriales (Gangadharan y col., 2009). Sin embargo, las condiciones ambientales bajo las que están sometidos los microorganismos, así como la disponibilidad de fuentes de carbono, limitan la probabilidad de encontrar, en cada uno de estos nichos, microorganismos productores de amilasas. Pocos microorganismos productores de amilasas, como *Thermotoga marítima*, han sido aislados de nichos en los que crecen a temperaturas y concentración de sales elevadas. Por lo que es más frecuente encontrar reportes de microorganismos productores de amilasas que no están sometidos a condiciones extremas de crecimiento. El suelo es uno de los lugares preferentes para encontrar microorganismos productores de amilasas, por ejemplo, *B. licheniformis* BS₁ (Vaseekaran y col., 2010), *B. subtilis* MA9, *B. cereus* MK8 (Devi y col., 2010) y diversas cepas de *B. amyloliquefaciens* (www.atcc.org/), han sido aisladas de este nicho.

1.4.1 Suelos

El suelo posee el ambiente idóneo para el desarrollo de una inmensa diversidad fenotípica y genotípica de microorganismos (Nogales, 2005; Øvreås y Tosrvik, 2002; Øvreås y Tosrvik,

1998). Un gramo de suelo puede contener 7×10^9 millones de miles microorganismos de especies diferentes (Alexander, 1977), pero solo alrededor del 1% se caracteriza, lo cual indica que los ecosistemas del suelo son poco conocidos (Øvreås y Tosrvik, 2002).

Los suelos se clasifican con base en sus características morfométricas. Los organismos internacionales como Soil Survey Staff (SSS por sus siglas en inglés) y la FAO/UNESCO los han agrupado de acuerdo a la tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los suelos según la SSS y la FAO/UNESCO

Soil Survey Staff (SSS)	FAO/UNESCO
Alfisol	Luvisol
Andisol	Andosol
Aridisol	Calcisol, Gypsisol, Solonchank, Solonetz
Entisol	Arenosol, Fluvisol, Leptosol, Regosol
Histosol	Histosol
Inceptisol	Cambisol
Mollisol	Chernozem, Greyzems, Kastanozems, Pheanozems
Oxisol	Allisol, Ferrasol, Nitosol, Plinthosol
Spodosol	Podzol
Ultisol	Acrisol, Lixisol
Vertisol	Vertisol

En general, México cuenta con diez de los veinticuatro tipos de suelos nombrados por la FAO/UNESCO. En el norte del país predominan los suelos del tipo calcisol, gypsisol, solonchank, solonetz, hacia el centro y sur del país predominan los suelos del tipo cambisol y en algunas partes del país hay presencia de suelos chernozem, greyzems, kastanozems, phaenozems y andosol, los cuales pueden ser arcillosos, de textura fina, de colores pardos hasta negros y ser ricos en nutrientes (Smith y Smith, 2000).

El suelo del estado de Oaxaca, México, es variado ya que depende de la ubicación geográfica, pero en general se pueden encontrar suelos del tipo cambisol, phaenozems, vertisol, calcisol, fluvisol, leptosol, andosol, ferrasol y regosol (OEIDRUS-OAXACA, 2005), que se caracterizan por ubicarse tanto en llanuras como en terrenos rocosos y por ser ricos en materiales orgánicos y en minerales, lo que los hace ideales para la agricultura (anexo IV).

1.4.2 Características de la Cuenca del Papaloapan y de sus suelos

La Cuenca del Papaloapan, conformada por el río Papaloapan y sus afluentes, se ubica en el sureste de México, abarcando los estados de Puebla, Oaxaca y Veracruz. En el estado de Oaxaca la región del Papaloapan tiene un clima cálido semihúmedo y húmedo, con una precipitación anual promedio de 1,300 a 3,000mm. Esta región se encuentra al Noroeste de la Sierra de Oaxaca o Sierra Norte, con una latitud norte de 18° 05', una longitud oeste de 96° 08', a una altitud de 20m.s.n.m. El río Papaloapan se forma en las selvas tropicales y bosques templados de la Sierra Mazateca del estado de Oaxaca y vierte sus aguas hacia el norte, sobre la planicie costera del Golfo de México. Debido a la humedad y al clima, existe una diversidad de especies vegetales y animales, terrestres y acuáticas, nativas y exóticas. Por lo anterior, los suelos de esta región son muy fértiles, el 30% de la superficie cultivable es de caña de azúcar, el 70% restante lo ocupan los cultivos de maíz, arroz, piña, frijol, tabaco, plátano, mango, coco y lichi (OEIDRUS-OAXACA, 2005). Los suelos que predominan en esta región son ferrasol, fluvisol y phaenzems, los cuales tienen características muy particulares que permiten la existencia de microorganismos productores de enzimas (CODICE A.C, 2010), por ejemplo, los pheanzems generalmente son suelos blandos, los fluvisoles contienen materiales inorgánicos y los ferrasoles son ricos en hierro (Smith y Smith, 2000). Hasta el momento, los suelos de la región de la Cuenca del Papaloapan, no han sido sujetos de estudio para el aislamiento de cepas bacterianas productoras de enzimas.

CAPÍTULO II

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los suelos de la Cuenca del Papaloapan han sido poco explorados en la búsqueda de microorganismos productores de enzimas de interés industrial, como amilasas, a pesar de que son las más demandadas en el mercado de enzimas. Además, no existen estudios para una propuesta local de aislamiento de microorganismos productores de amilasas, ni de estrategias de producción de estas enzimas.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Dada la demanda de amilasas en la industria (alimentaria, de procesos, farmacéutica, etc.) para la degradación y/o procesamiento de almidón, las condiciones climático-ambientales de la Cuenca del Papaloapan, así como la poca exploración de los suelos de dicha región para la búsqueda de microorganismos productores de amilasas, este trabajo propone aislar e identificar bacterias con actividad amilolítica, asimismo caracterizar las amilasas producidas con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial aplicación industrial.

2.3 HIPÓTESIS

Existen bacterias productoras de enzimas, como amilasas, en suelos cultivados con caña de azúcar en la Cuenca del Papaloapan. Dichas enzimas poseen propiedades catalíticas adecuadas para ser propuestas en diversas industrias.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Aislar e identificar bacterias productoras de amilasas, así como caracterizar las amilasas producidas por éstas.

2.4.2 Objetivos particulares

- Aislar bacterias productoras de amilasas de suelos cultivados con caña de azúcar en la Cuenca del Papaloapan.
- Seleccionar, identificar y caracterizar los aislados bacterianos que presenten mayor actividad amilasa.
- Obtener amilasas a partir del cultivo líquido de las cepas identificadas y seleccionadas.
- Purificar y caracterizar las amilasas producidas por las cepas seleccionadas, evaluando el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.

2.5 METAS

- Obtención de aislados bacterianos productores de amilasas a partir de los suelos muestreados.
- Caracterización bioquímica, identificación y clasificación de los aislados bacterianos seleccionados.
- Caracterización enzimática parcial de las amilasas producidas por las cepas seleccionadas evaluando el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Toma de muestra de suelos

Se seleccionaron al azar, regiones cercanas a Tuxtepec en las que se cultiva caña de azúcar. En el mes de junio, se colectaron muestras de aproximadamente 0.5kg de suelos de cultivos de caña de azúcar de mediana edad. Las muestras se tomaron aleatoriamente de terrenos planos a dos profundidades, 0-15cm y 15-30cm, obteniendo una muestra homogénea para cada profundidad, posteriormente se colocaron en bolsas herméticas de nylon y se transportaron, a temperatura ambiente, al laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan en donde se procesaron.

3.1.2 Aislamiento de bacterias productoras de amilasas

Las muestras se disolvieron hasta una concentración de 1g/l en agua peptonada 1% (p/v) estéril, posteriormente se hicieron diluciones seriales de 10^{-1} hasta 10^{-6} , se sembraron en agar nutritivo (extracto de carne 1g/l, extracto de levadura 2g/l, peptonas 5g/l, agar 15g/l) BD Bioxon en cajas petri, e inoculando por duplicado 100 μ l de cada dilución y se incubaron (Horno Felisa FE-132AD) a 37°C por 48 h. Posteriormente, se realizó un conteo en placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC), empleando un contador de colonias (SOLBAT Q20), determinándose el porcentaje de colonias productoras de amilasas en el suelo seleccionado. Posteriormente se calculó la densidad microbiana de cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{n}{100\mu\text{l}} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{g}} \times \frac{1}{10^{-1}} = \frac{UFC}{g}, \text{ donde } n \text{ representa el número de colonias definidas.}$$

3.1.3 Escrutinio de actividad amilasa de los aislados bacterianos

Las colonias bacterianas se seleccionaron y se aislaron de acuerdo a su morfología macroscópica (colonia circular), posteriormente se resembraron por duplicado en cajas petri con agar nutritivo (BD Bioxon) enriquecido con almidón al 1% (p/v) (Mendu y col., 2005; Mitsuiki y col., 2005; Ezeji y Bahl 2006) mediante la técnica de picadura, apoyándose de una cuadrícula numerada. Las cajas se incubaron (Horno Felisa FE-132AD) a 37 °C por 48 h, después se realizó un revelado *in situ* de la actividad amilasa bañando la caja con una solución de lugol (0.33% p/v de I y 0.66% p/v de KI en agua destilada) e incubando por 15min. Las colonias bacterianas que presentaron actividad amilasa mostraron un halo transparente alrededor después de agregar lugol (Smith y Roe 1949; Van Loon y col., 1952; Fuwa, 1954; Xiao y col. 2006).

3.1.4 Selección de aislados bacterianos con mayor actividad enzimática

Los aislados bacterianos que mostraron actividad amilasa se sembraron por duplicado en cajas con 9.3g/l de agar nutritivo (BD Bioxon) enriquecido con almidón al 1% (p/v) para verificar su actividad amilolítica. Asimismo, se verificó la pureza de los aislados mediante morfología macro y microscópica. Los aislados bacterianos se incubaron por duplicado (Horno Felisa FE-132AD) a 37°C por 48 h. Al término, los aislados bacterianos que mostraron un halo significativamente mayor con respecto al tamaño de la colonia, después del revelado con lugol, se seleccionaron y conservaron a 4°C para experimentos posteriores. Los aislados bacterianos seleccionados se crecieron en tubos de ensaye de 10-15 ml conteniendo 5 ml de caldo nutritivo (BD Bioxon) enriquecido con almidón al 1% (p/v) a 37°C, 180rpm durante una noche en una incubadora con agitación orbital (New Brunswick Scientific Escella E24). Los aislados se conservaron en glicerol al 40% (v/v), diluyendo en proporción 1:1 cultivo: glicerol (J.T.Baker) al 80% respectivamente, almacenándolos en criotubos estériles a -20°C, como stock.

3.1.5 Caracterización bioquímica y molecular de los aislados bacterianos

Con la finalidad de caracterizar microscópicamente y determinar posible patogenicidad, se realizó una tinción de Gram a cada uno de ellos con el kit Tinción de Gram (HYCEL). Cada aislado bacteriano se fijó por calor a un portaobjetos y se tiñó siguiendo las indicaciones del proveedor, observando las características individuales de cada aislado en microscopio óptico (OLYMPUS CX41RF/SP-320) con los objetivos 40 y 100x.

Para realizar una diferenciación bioquímica de los aislados bacterianos se utilizaron las galerías API20A (bioMerieux) para bacterias Gram positivas y API20E (bioMerieux) para bacterias Gram negativas siguiendo las indicaciones del proveedor.

Como parte de la caracterización e identificación de los aislados bacterianos, estos se inocularon por separado en tubos de ensaye de 10-15 ml con 5ml de caldo nutritivo, se incubaron a 37°C a 180 rpm durante una noche, posteriormente se extrajo el ADN genómico de cada aislado siguiendo las especificaciones del kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation (MO BIO). Se amplificó el gen 16S mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para cada aislado. Las condiciones de reacción y componentes usados se muestran en la tabla 7 y 8 respectivamente.

Tabla 7. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S

No. de ciclos	Etapa	Tiempo (min)	T (°C)
1	Desnaturalización	5	94
30	Desnaturalización	1	94
	Alineamiento	0.5	56
	Extensión	1.40	72
1	Extensión final	10	72

Tabla 8. Componentes de PCR para amplificar el gen 16s

Componente	Volumen (µl)
H ₂ O	75
10x Taq Buffer	10
dNTP Mix 10Mm	2
MgCl ₂ 25mM	6
*Oligonucleótido fD1 10µM	2
**Oligonucleótido rD1 10µM	2
ADN	1
Taq polymerase 1U/µl (Fermentas)	2

* Oligonucleótido fD1 (CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

** Oligonucleótido rD1 (CCCGGGATCCCAAGCTTAAGGGGTGATCCAGCC)

Volumen de reacción: 100µl.

La integridad tanto del ADN genómico como del producto de la amplificación del gen 16S y de su purificación, se verificó mediante electroforesis horizontal (MINI SUB[®] CELL GT BIO-RAD), para lo cual se cargaron 2µl de cada muestra en un gel de agarosa 0.8% mezclado con 1µl de SBX 6X (sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cyanol 0.25% (p/v)). Las condiciones de corrida fueron 85V, 400mA por 1.5h, como amortiguador de electroforesis se usó TAE 1X (4.84g de tris base, 1.142ml de ácido acético glacial, 2ml de EDTA 0.5M pH 8.0). El gel se tiñó con una solución de C₂₁H₂₀BrN₃ (bromuro de etidio) 0.5µg/ml por 20-30min (Bej y col., 1991) y se lavó con agua destilada por 15min. Posteriormente se observó en fotodocumentación (Ingenius LHR SYNGENE) empleando el programa GeneSnap.

Los productos de PCR del gen 16S se purificaron utilizando el kit High Pure PCR product purification (ROCHE), siguiendo las indicaciones del proveedor y posteriormente fueron secuenciados por Macrogen Inc. Korea.

Con las secuencias se realizó un análisis filogenético que se obtuvo de un proceso de máxima verosimilitud, bajo un modelo de sustitución de tres parámetros Tamura Nei y con 1500 réplicas de Bootstrap, empleando el programa MEGA V.4.

3.1.6 Selección de fuentes de nitrógeno para incrementar la producción de amilasas

Con base en la literatura y en las características particulares de cada aislado bacteriano identificado, se seleccionó un medio de cultivo idóneo para mejorar la producción de amilasas. El medio consistió en medio Mandel (MM) enriquecido con almidón, al cual se le varió la fuente de nitrógeno (tabla 9), adicionalmente se comprobó el efecto del ión Ca^{2+} sobre la actividad amilasa. Este seguimiento se planeó mediante un diseño factorial con bloques y se realizó en cuatro etapas, midiendo por triplicado en cada una de ellas, el diámetro del halo de hidrólisis dividido entre el diámetro de la colonia, estableciendo así la relación halo: diámetro de la colonia (H:Dc), en medio sólido (fig. 11). El aumento de esta relación está vinculada con el incremento de la producción de la enzima (Vaseekaran, 2010). Los valores de la relación H:Dc se analizaron mediante la prueba de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), usando el programa estadístico MINITAB V.14.

Tabla 9. Componentes del medio de cultivo seleccionado

Medio Mandel enriquecido	Concentración (g/l)	Referencia
(NH_4) ₂ SO ₄ (J.T.Baker)	5	Zhang y col., 1983; Asgher y col., 2005
Citrato de sodio (J.T.Baker)	0.5	Zhang y col., 1983
K ₂ HPO ₄ (SIGMA-ALDRICH)	6	Vaseekaran y col., 2010; Zhang y col., 1983
KH ₂ PO ₄ (SIGMA-ALDRICH)	3	Gangadharan y col., 2006
MgSO ₄ (J.T.Baker)	0.2	Zhang y col., 1983; Asgher y col., 2005
MnSO ₄ (J.T.Baker)	0.01	Zhang y col., 1983
FeSO ₄ (J.T.Baker)	0.01	Asgher y col., 2005; Zhang y col., 1983
ZnSO ₄ (J.T.Baker)	0.001	Zhang y col., 1983; Asgher y col., 2005
Almidón (Jalmek)	10	Gangadharan y col., 2006; Souza y Leal, 2000
Fuente de nitrógeno		
Extracto de Levadura (DIBICO)	5	Asgher y col., 2005; Souza y Leal, 2000

Peptona (BD Bioxon)	10	Souza y Leal, 2000, Vaseekaran y col., 2010
Glicina (SIGMA-ALDRICH)	1	Zhang y col., 1983
*CaCl ₂ (DIBICO)	0.1	Vaseekaran y col., 2010; Asgher y col., 2005

* Aunque no se considera una fuente de nitrógeno, está reportado que el Ca²⁺ aumenta significativamente la actividad de las amilasas.

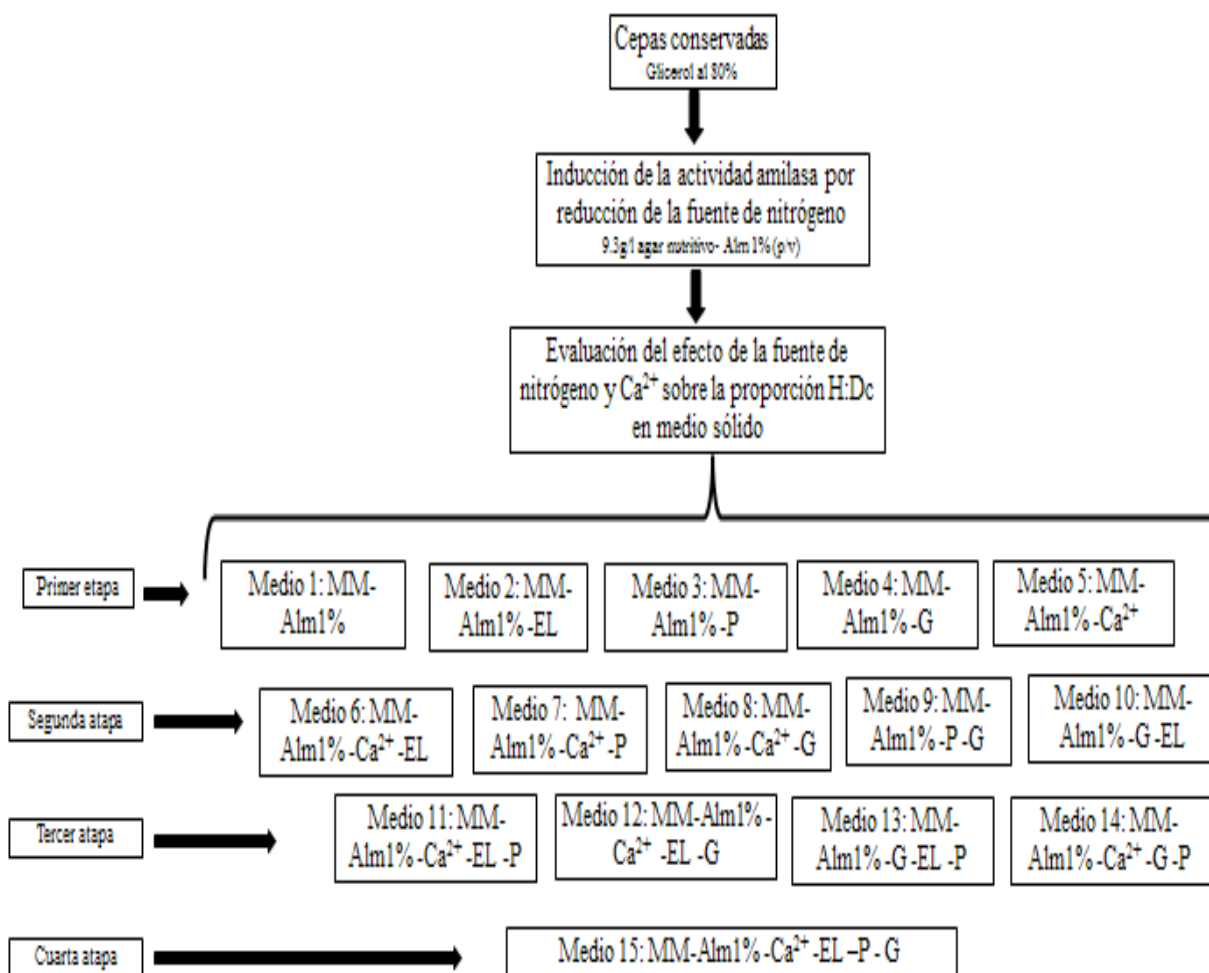


Fig. 11. Esquema del procedimiento para evaluar la fuente de nitrógeno sobre la relación H: Dc.

De acuerdo al análisis estadístico se seleccionó un medio de cultivo, mismo que fue utilizado para realizar la fermentación líquida del aislado bacteriano seleccionado. Posteriormente, se recuperó la enzima.

El aislado bacteriano se cultivó en medio líquido a 37°C, 180rpm evaluando su crecimiento mediante espectrofotometría a 600nm (Lambda 25 L600-00BB Perkin Elmer), asimismo se cuantificó la producción de azúcares reductores mediante DNS (Miller, 1959) a 540nm. La fermentación se concluyó al final de la fase estacionaria. El sobrenadante de la fermentación se recuperó por centrifugación (HEREAUS MEGAFUGE 16R Thermo SCIENTIFIC) a 5500rpm por 15min. El sobrenadante fue llamado extracto crudo enzimático.

3.1.7 Precipitación de AmiJ33 con sulfato de amonio

El extracto crudo enzimático se saturó al 20, 40, 60 y 90% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) (J.T.Baker). Después de cada saturación, el extracto crudo enzimático se centrifugó a 10000xg por 10min (HEREAUS MEGAFUGE 16R Thermo SCIENTIFIC). Se obtuvieron cuatro precipitados, procedentes de las cuatro saturaciones, los cuales se resuspendieron y lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0, 1mM CaCl_2 , utilizando filtros de 10,000 MWCO (MILIPORE) y centrifugando a 5500rpm por 15min (HEREAUS MEGAFUGE 16R Thermo SCIENTIFIC). Utilizando los mismos filtros, se concentró cada precipitado cien veces el volumen inicial del extracto crudo enzimático.

3.1.8 Cuantificación de proteína extracelular total

La concentración de proteína total del extracto crudo enzimático se determinó usando el reactivo de Bradford (1976) (QUIAGEN). Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (EQUITECH-BIO, INC.) en concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 $\mu\text{g/ml}$ para realizar una curva estándar midiendo absorbancia a 595nm mediante espectrofotometría (Lambda 25 L600-00BB Perkin Elmer).

3.1.9 Determinación de la actividad amilasa

La actividad amilasa se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 10g/L de almidón en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0, 1mM CaCl₂ a 37°C (Sumer y Howell, 1935). Los azúcares reductores se determinaron mediante DNS (Miller, 1959) utilizando una curva estándar de glucosa y midiendo a 540 nm mediante espectrofotometría (Lambda 25 L600-00BB Perkin Elmer). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se definió una unidad (U) como un μmol de azúcar reductor, equivalente a glucosa, producido por minuto.

3.1.10 Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra System BIO –RAD), para geles de 1 mm de espesor. El gel concentrador se preparó al 4% y el de separación al 10%. Las proteínas que se logran separar bajo estas condiciones pesan entre 50 y 200kDa. La migración se efectuó a corriente constante de 15mA. Se utilizó como amortiguador de corrida una solución de: tris-base 15.1g/l, glicina 72g/l y SDS 5g/l y 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).

El peso molecular de las bandas observadas, se calculó mediante una relación lineal entre el peso molecular de las bandas del marcador de proteínas y su movilidad electroforética, expresada en centímetros, a través del gel de poliacrilamida.

3.1.11 Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Posterior a la electroforesis, el gel se tiñó durante 10min en una solución de ácido acético glacial 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de Coomassie 0.2% (v/v). Después, el gel se

lavó para eliminar los excesos del colorante con una solución de ácido acético glacial 10% (v/v) y metanol 30% (v/v).

3.1.12 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad amilasa

El efecto del pH sobre la actividad se realizó midiendo la actividad de la enzima a pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 a 50°C con 0.5% (p/v) de almidón, 1mM de CaCl₂ y 1U/ml de enzima usando amortiguador de fosfatos para pH 7.0 y 8.0 y amortiguador de acetatos para pH 4.0, 5.0 y 6.0. Todas las mediciones se realizaron a 50°C. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa, se midió la actividad a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C, a diferentes intervalos de tiempo, en presencia de almidón al 0.5% (p/v) y 1mM de CaCl₂, usando 1U/ml de enzima. En todos los casos el almidón al 0.5% (p/v) se preincubó durante 5min a la temperatura estudiada, iniciando el ensayo de actividad al colocar la enzima. La actividad enzimática se determinó cuantificando azúcares reductores mediante DNS (Miller, 1959). Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toma de muestra

Las muestras fueron colectadas en suelos cultivados con caña de azúcar, los cuales son quemados durante la cosecha. Los lotes se encuentran a un lado de la carretera que lleva a la comunidad de San Lucas Ojitlán, Oaxaca México, con ubicación 18° 7' norte, 96° 17'.577 oeste, 50m de altitud. De acuerdo con los tipos de suelos existentes en la región de la Cuenca del Papaloapan, y a las características del suelo muestreado, se determinó que el suelo del área de colecta era del tipo pheanozems (tabla 6, anexo IV).

4.1.2 Aislamiento de cepas bacterianas con actividad amilasa

Se determinó, a partir de la dilución 10^{-1} , que la densidad bacteriana de las muestras de suelo con profundidad de 0-15cm fue de 2.1×10^5 UFC/g suelo y de 1.1×10^5 para la muestra con profundidad de 15-30cm, valores menores de los reportados para suelos silvestres y compostas, 9×10^8 UFC/g de suelo (Torres, 2006) y 1×10^{12} UFC/g de suelo (www.manualdelombricultura.com) respectivamente. Estudios de flora bacteriana, hechos en Colombia durante el periodo de marzo-mayo, de suelos del tipo pheanozems cultivados con caña de azúcar, indican que los suelos en los que se cosecha caña de azúcar sin quemar existe una carga bacteriana de 7 a 4×10^8 UFC/g de suelo, en profundidades de 0-20cm, mientras que a profundidades de 20-40cm la carga microbiana es de 3.5×10^8 UFC/g de suelo. Sin embargo, en los suelos donde se cosecha quemándola, la carga bacteriana es de 5 a 2×10^8 UFC/g de suelo, en profundidades de 0-20cm y de 1.8×10^8 UFC/g de suelo, en profundidades de 20-40cm (Torres, 2006). Resulta evidente que la quema de la caña de azúcar disminuye la carga microbiana existente en el suelo.

A partir de la dilución 10^{-1} , de las muestras de suelo con profundidad de 0-15cm, se aislaron 21 colonias bacterianas definidas. Cuatro de ellas fueron positivas para actividad amilasa. Se conservaron según la metodología descrita en este trabajo y se nombraron JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N (fig. 12).

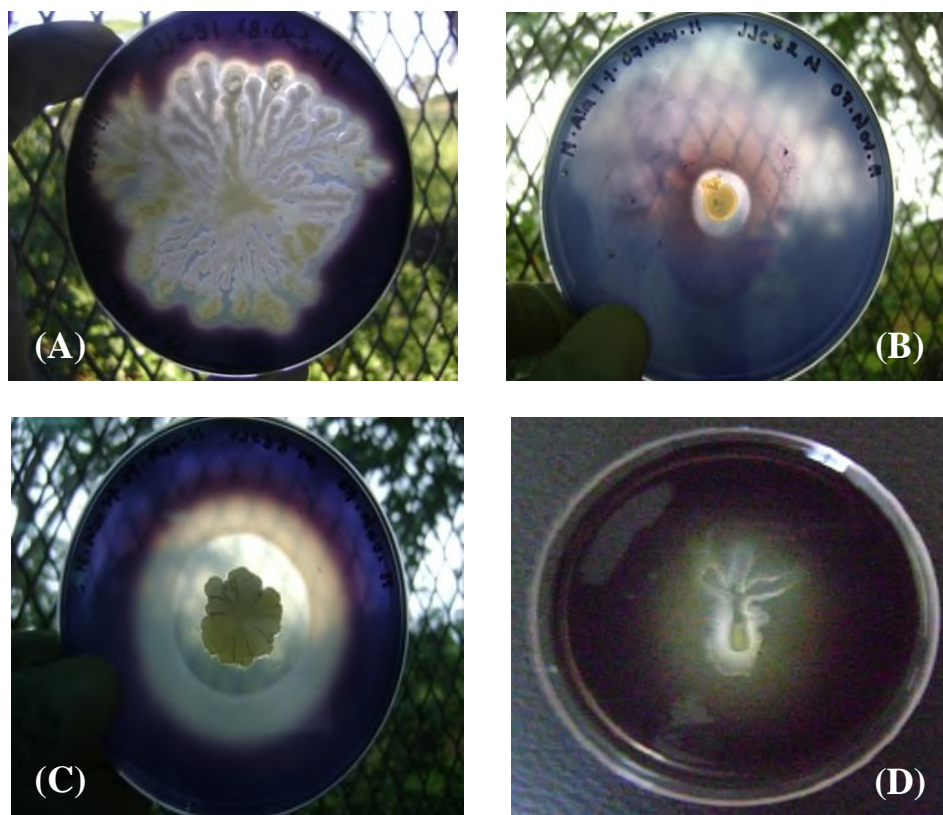


Fig. 12. Aislados bacterianos con actividad amilasa. (A) JJC31, (B) JJC32, (C) JJ33M, (D) JJC33N.

Cabe señalar que se han aislado microorganismos productores de amilasas del suelo existente alrededor de molinos, de cultivos de yuca y de fábricas que procesan harina (Fossi y col., 2005). En estos sitios es muy evidente la presencia de una fuente de almidón. Pudiera pensarse que en cultivos de caña de azúcar no sería posible encontrar bacterias productoras de amilasas dadas las características del cultivo, ya que la caña de azúcar está compuesta en su mayoría por agua, celulosa y lignina, sin embargo, esta planta contiene entre 50 y 70mg de granulos de almidón/l de jugo (Meade y Chen, 1977) dependiendo de la variedad (Imrice y Tilbury, 1972), que muy probablemente junto con la fibra se devuelven

al suelo para enriquecerlo, favoreciendo así la existencia de microorganismos productores de amilasas.

Las características morfológicas macroscópicas de cada uno de los cuatro aislados bacterianos se muestran en la tabla 10. Adicionalmente se clasificaron como Gram positivos o negativos con base en la tinción de Gram observándose sus características morfológicas microscópicas. Los cuatro aislados tienen forma bacilar, los aislados JJC31, JJC33M y JJC33N son Gram positivos, mientras que el aislado JJC32 es Gram negativo (fig. 13).

Tabla 10. Características morfológicas macroscópicas de los aislados bacterianos.

Característica	Aislado bacteriano			
	JJC31	JJC32	JJC33M	JJC33N
Forma	Irregular	Regular	Irregular	Irregular
Elevación	Plana	Cóncava	Plana con pliegues	Plana con pliegues y formación de bolsas
Opacidad	Opaca	Brillante	Opaca	Opaca
Color	Crema	Crema	Café	Blanco con crema
Superficie	Semi húmeda	Húmeda	Seca, polvosa	Seca
Margen	Ramificado	Circular	Ondeado	Ramificado

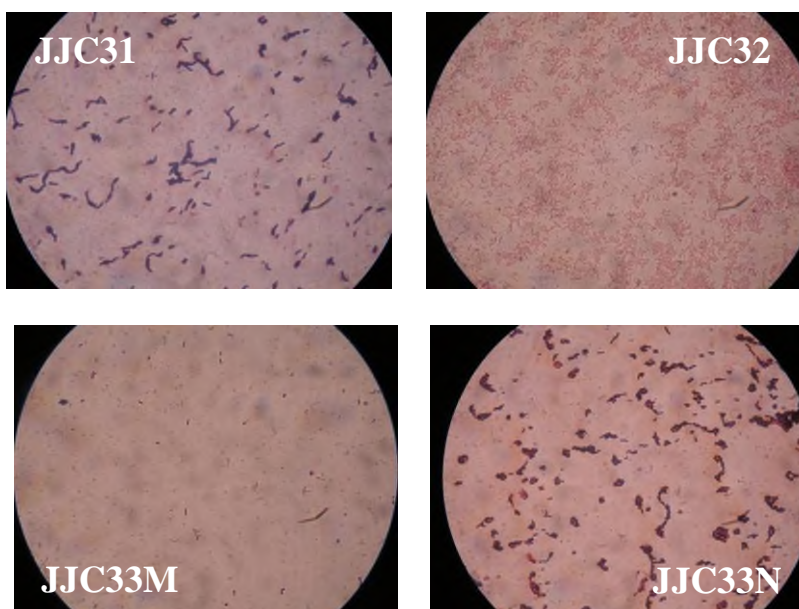


Fig. 13. Morfología microscópica y tinción de Gram de los aislados bacterianos con actividad amilasa.

A nivel industrial, generalmente las fuentes bacterianas productoras de amilasas son Gram positivas, por ejemplo *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ya que son no patógenos (Vihinen y Mantsala, 1989; Vaseekaran y col., 2010). A pesar de que existen bacterias Gram negativas productoras de amilasas, no son utilizadas a nivel industrial por su relación con la patogenicidad, por ejemplo *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* (Saltom y Kim, 1996).

Es de suma importancia clasificar e identificar el microorganismo productor, ya que para que la enzima se utilice a nivel industrial, sobre todo en el sector alimentario, se requiere que el microorganismo productor sea reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Guillén y col., 2012).

4.1.3 Caracterización bioquímica y molecular de los aislados bacterianos seleccionados

Con la finalidad de determinar que tipo de sustratos pueden metabolizar los aislados bacterianos JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N se utilizaron las galerías API 20A para las bacterias Gram positivas: JJC31, JJC33M y JJC33N y API 20E para bacterias Gram negativas: JJC32 (fig. 14 y tablas 11 y 12).



Fig. 14. Galerías API metabolizadas por los aislados bacterianos seleccionados, API 20A: (A) JJC31, (C) JJC33M, (D) JJC33N y API 20E: (B) JJC32, después de incubar por 48h a 37°C en anaerobiosis.

Tabla 11. Sustratos metabolizables por los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N (galería API 20A).

Prueba bioquímica	JJC31	JJC33M	JJC33N
Ureasa	-	-	-
Catalasa	+	+	+
β-glucosidasa	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+
Producción de indol	-	-	-
Glucosa	+	+	+
Manitol	-	+	-
Lactosa	-	-	-
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	-	-	-
Salicina	-	-	-
Xilosa	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Celobiosa	-	-	-
Manosa	-	-	-
Melezitosa	-	-	-
Rafinosa	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Trealosa	-	-	-

Tabla 12. Sustratos metabolizables por el aislado bacteriano JJC32 (galería API 20E)

Prueba bioquímica	JJC32
β -galactosidasa	+
Arginina deshidrolasa	+
Lisina deshidrolasa	-
Ornitina descarboxilasa	+
Ureasa	-
Triptofano desaminasa	-
Gelatinasa	-
Producción de indol	-
Producción de acetoina	-
Glucosa	+
Manitol	+
Sorbitol	+
Ramnosa	+
Sacarosa	+
Arabinosa	+
Melobiosa	+
Amigdalina	+
Citrato	+
Inositol	-

El perfil metabólico, de acuerdo a la galería API 20A de los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N (tabla 11) muestra dos puntos de importancia. El primero, que los aislados bacterianos producen, además de α -amilasas, β -glucosidasas o celulasas, las cuales están implicadas en la hidrólisis de celulosa (Kofod, 1995) y cuya actividad se demostró en otros experimentos que no se muestran en este trabajo. El segundo, que los tres aislados bacterianos pueden metabolizar glucosa y sacarosa, por lo que necesariamente deben contar con enzimas que les permitan acceder a la glucosa a partir de polímeros como el almidón y la celulosa. En el cultivo de caña de azúcar, parte del bagazo, compuesto por celulosa, es reincorporado al suelo de cultivo para enriquecerlo, llevando consigo pequeñas cantidades de almidón y de sacarosa, además solo el aislado bacteriano JJC33M puede metabolizar también manitol, el cual es un monosacárido muy similar a la glucosa.

El perfil metabólico del aislado bacteriano JJC32, de acuerdo a la galería API 20E, muestra que además de producir amilasas, produce β -galactosidasas las cuales están implicadas en la hidrólisis de lactosa, por lo que a pesar de ser un aislado bacteriano patógeno, pueden aislarse los genes de su α -amilasa y β -glucosidasa, para producir estas enzimas mediante transgénesis en sistemas bacterianos ya establecidos. Se observa también que este aislado bacteriano puede metabolizar glucosa, manitol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa,

amigdalina y arabinosa. Estos sustratos pueden ser utilizados en el medio de cultivo para probar su efecto sobre la producción de su amilasa.

Tanto las galerías API 20A como las API 20E se complementan con un programa especializado llamado *apiweb*TM para realizar la identificación de los aislados bacterianos, sin embargo, este programa es muy costoso y no se cuenta en la institución con él, por lo que la información proporcionada por las galerías solo indica las moléculas que se pueden utilizar como fuentes de carbono y nitrógeno en un cultivo sólido o líquido y se complementa con lo observado en la tinción de Gram. Por lo tanto para complementar la identificación de los aislados bacterianos JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N fue necesario realizar el análisis del marcador 16S DNA.

Mediante el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), se determinó que las secuencias del gen16S de los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N, presentan 99% identidad a la secuencia del gen 16S reportada para *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535 (Nishiwaki y col., 2006), mientras que el gen 16S, del aislado bacteriano JJC32 presenta un 99% de identidad a la secuencia 16S reportada para *Enterobacter asburiae* JCM6051 (Harada y col., 1996) (anexo D). Para tener una identificación más fina, se realizó la filogenia de las secuencias utilizando el programa MEGA V.4 donde se hicieron alineamientos múltiples de las secuencias del gen16S de los aislados bacterianos JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N, con secuencias del gen 16S de diversas bacterias, para construir un árbol filogenético

Filogenéticamente, los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N están en el clado de *B. amyloliquefaciens* (fig. 15), por lo que se considera que corresponden a dicha especie, sin embargo, para clasificar adecuadamente dichos aislados bacterianos, también hay que tomar en cuenta sus características morfológicas macroscópicas (fig. 11, tabla10), así como los sustratos metabolizables por los aislados. A pesar de que los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N pertenecen al mismo género y especie, muy probablemente pertenecen a subespecies diferentes, será necesario realizar análisis moleculares adicionales como los de la región ITS 23S (Xu y Coté, 2003). Por otro lado, el aislado bacteriano JJC32 está en el clado de *Paenibacillus amylolyticus*, resultado que difiere de lo obtenido con el BLAST de la secuencia 16S, sin embargo se puede atribuir esta diferencia a la poca fidelidad de la

secuencia. No obstante, se optó por considerar la aproximación filogenética como el método más confiable para establecer una primera clasificación del aislado bacteriano JJC32. Ya que de acuerdo con las pruebas bioquímicas JJC32 también produce β -galactosidasa. Se sabe que el género *Paenibacillus* produce β -galactosidasa (Shida y col., 1997) a diferencia del género *Enterobacter*, con base en ello, se consideró que el aislado bacteriano JJC32 corresponde a *P. amylolyticus* (fig. 15).

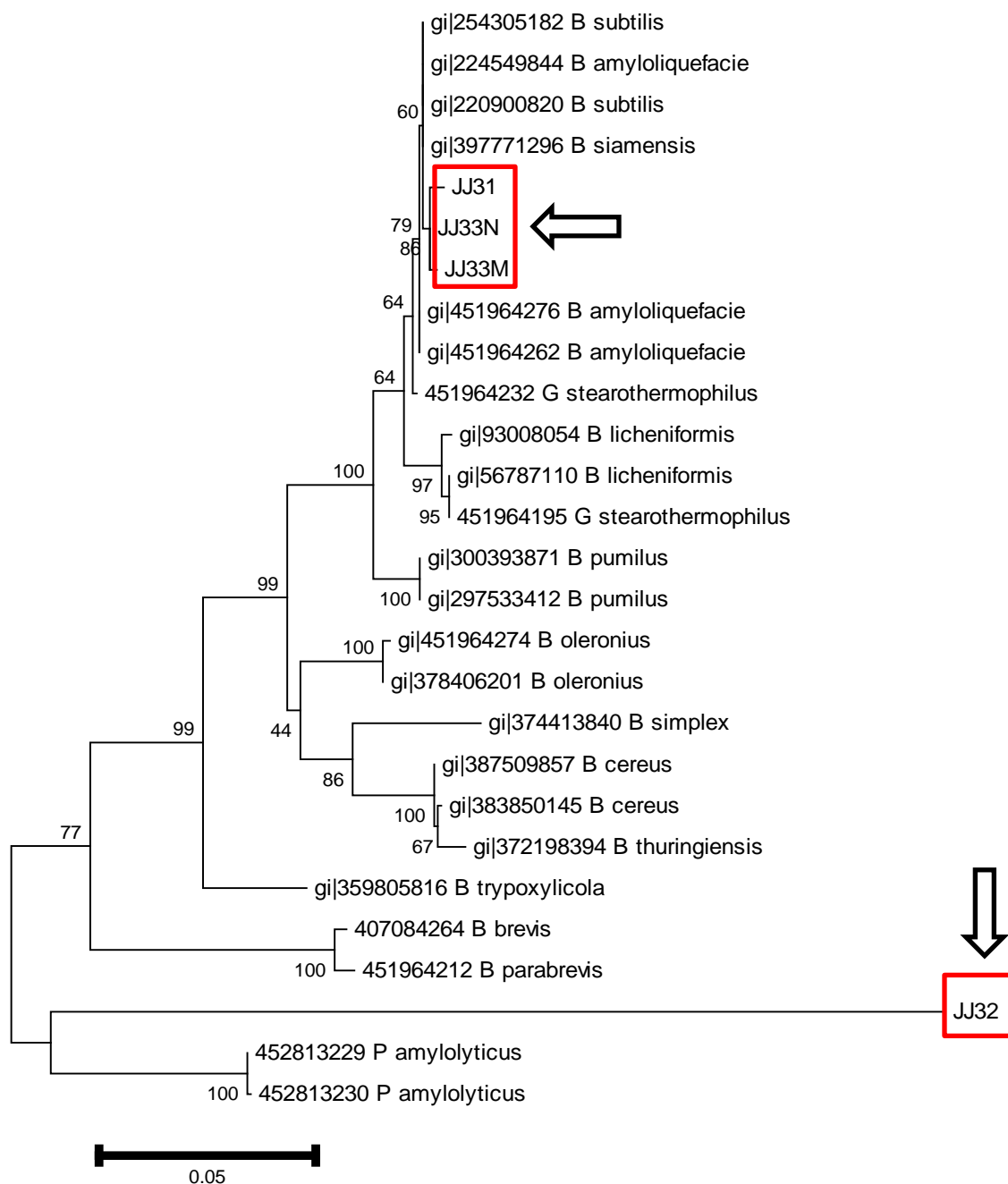


Fig. 15. Árbol filogenético de los aislados JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N.

Con base en la literatura revisada, *B. amyloliquefaciens* produce un solo tipo de amilasa, la cual ya ha sido caracterizada. Con la información derivada de la filogenia de los aislados, se sugiere que la actividad de los aislados bacterianos JJC31, JJC33M y JJC33N, observada en caja, corresponde a la de α -amilasas. Sin embargo, no se puede concluir con certeza que tipo de actividad se observó en caja por el aislado bacteriano JJC32, debido a que algunas bacterias del género *Paenibacillus*, producen α y β amilasas (www.rcsb.org/pdb).

4.1.4 Selección de la fuente de nitrógeno para incrementar la producción de amilasas

Primera etapa

P. amylolyticus JJC32, no presentó actividad amilasa bajo ninguna condición (tabla 13), a pesar de que en las etapas de escrutinio y purificación, donde se utilizó agar nutritivo enriquecido con almidón 1% (p/v) sí presentó actividad amilasa. Es posible que *P. amylolyticus* JJC32 requiera, para expresar la proteína, de la combinación de extracto de carne, en lugar extracto de levadura, con peptona o haya una inhibición por parte de las sales que componen el medio Mandel (MM). Con estos resultados, la amilasa de *P. amylolyticus* JJC32 fue descartada para su uso en este trabajo.

La relación H:Dc de *B. amyloliquefaciens* JJC31 y JJC33N, fue difícil de medir durante esta primera etapa, debido a que no se pudo establecer la relación H:Dc, como consecuencia de la morfología de crecimiento de las cepas bacterianas (fig. 12), por lo que el experimento se tuvo que repetir en numerosas ocasiones. Cabe resaltar que *B. amyloliquefaciens* JJC31 y *B. amyloliquefaciens* JJC33N, mostraron estadísticamente ($\alpha=0.05$) los valores más altos de la relación H:Dc empleando MM-Alm1% (2.25) y G-MM-Alm1% (2.50) respectivamente (tabla 13). *B. amyloliquefaciens* JJC33M creció en forma circular y consecuentemente el halo de hidrólisis adquirió la misma forma, por lo que las mediciones de la relación H:Dc fueron más sencillas.

Tabla13. Primera etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilasa

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	DIÁMETRO DEL HALO* (cm)	DIÁMETRO DE LA COLONIA* (cm)	RELACIÓN H:Dc
<i>B. amyloliquefaciens</i> JJC31	MM-Alm1%	0.9 ± 0.17	0.4	2.25
	G-MM-Alm1%	0.7 ± 0.05	0.4	1.75
	P-MM-Alm1%	2.7 ± 0.15	2.2 ± 0.11	1.22
	EL-MM-Alm1%	2.2 ± 0.30	2.1 ± 0.34	1.04
	Ca ²⁺ -MM-Alm1%	0.6	0.4	1.50
<i>P. amylolyticus</i> JJC32	MM-Alm1%	ND	0.5	ND
	G-MM-Alm1%	ND	0.5	ND
	P-MM-Alm1%	ND	0.9	ND
	EL-MM-Alm1%	ND	0.9	ND
	Ca ²⁺ -MM-Alm1%	ND	0.5	ND
<i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	MM-Alm1%	0.6 ± 0.05	0.5	1.20
	G-MM-Alm1%	0.7	0.4	1.75
	P-MM-Alm1%	1.6	0.7 ± 0.05	2.28
	EL-MM-Alm1%	1.4 ± 0.05	0.6	2.33
	Ca ²⁺ -MM-Alm1%	0.7	0.4 ± 0.05	1.75
<i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33N	MM-Alm1%	0.6 ± 0.05	0.4	1.50
	G-MM-Alm1%	1.0	0.4	2.50
	P-MM-Alm1%	2.5	2.0	1.25
	EL-MM-Alm1%	2.3 ± 0.05	2.0	1.15
	Ca ²⁺ -MM-Alm1%	0.9	0.4	2.25

ND, no determinado por ausencia de halo.

*Algunos datos se muestran sin desviación estándar porque su valor es igual a cero.

Segunda etapa

En la segunda etapa de selección, donde se adicionó otra fuente de nitrógeno al medio de cultivo, solo se analizaron las cepas *B. amyloliquefaciens* JJC31, *B. amyloliquefaciens* JJC33M y *B. amyloliquefaciens* JJC33N (tabla 14). Las cepas *B. amyloliquefaciens* JJC31 y *B. amyloliquefaciens* JJC33N crecieron sobre toda la superficie de la caja sin mostrar halos de degradación, es decir la adición de una fuente de nitrógeno extra promovió la producción de biomasa, pero no de la enzima. Cabe mencionar que las cepas bacterianas con mayor nivel de expresión de amilasas, hidrolizan el almidón de su alrededor, pero no

nesariamente tienden a aumentar su biomasa, sin embargo, es necesario darle seguimiento en medio líquido para tener mayor certeza de lo planteado, requiriéndose de trabajo adicional. Para el caso de las cepas *B. amyloliquefaciens* JJC31 y *B. amyloliquefaciens* JJC33N, la mayor producción de amilasas se obtuvo con los medios de cultivo MM-Alm1% y G-MM-Alm1% respectivamente, según los resultados obtenidos durante la primera etapa. Por otro lado, en la cepa *B. amyloliquefaciens* JJC33M sí se observó un efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de la enzima (tabla 14, fig. 16), principalmente con EL-Ca²⁺-MM-Alm1%, alcanzando una relación H:Dc de 2.83. Las fuentes de nitrógeno más usadas, en el medio de cultivo, para la obtención de amilasas son peptona y extracto de levadura en diferentes concentraciones y combinaciones (Teodoro y Martins 2000; Santos y Martins 2003; Saxena y col., 2007). Por ejemplo, Kubarak y col., 2010 y Asgher y col., en 2006 utilizaron peptona y extracto de levadura en el medio de cultivo para estimular la producción de amilasas de *Bacillus sp.* BKL20 y *B. subtilis* JS-2004 respectivamente, Vaseekaran y col., en el 2010 utilizaron peptona en el medio de cultivo para la producción de amilasas por los aislados termofílicos BS1, FS1 y GS1 en caja.

Tabla 14. Segunda etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad α -amilasa.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	DIÁMETRO DEL HALO* (cm)	DIÁMETRO DE LA COLONIA* (cm)	RELACIÓN H:Dc
<i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	MM-Alm1%	0.7 ± 0.05	0.5	1.40
	EL-MM-Alm1%	1.4	0.7	2.00
	G-EL-MM-Alm1%	1.6 ± 0.05	0.6 ± 0.05	2.66
	P-EL-MM-Alm1%	1.7	0.8	2.12
	Ca ²⁺ -EL-MM-Alm1%	1.7	0.6 ± 0.05	2.83
	G- Ca ²⁺ -MM-Alm1%	0.8 ± 0.05	0.7	1.14
	G-P-MM-Alm1%	0.9 ± 0.05	0.7	1.28
	P-Ca ²⁺ -MM-Alm1%	0.9 ± 0.05	0.7	1.28

*Algunos datos se muestran sin desviación estándar porque su valor es igual a cero.

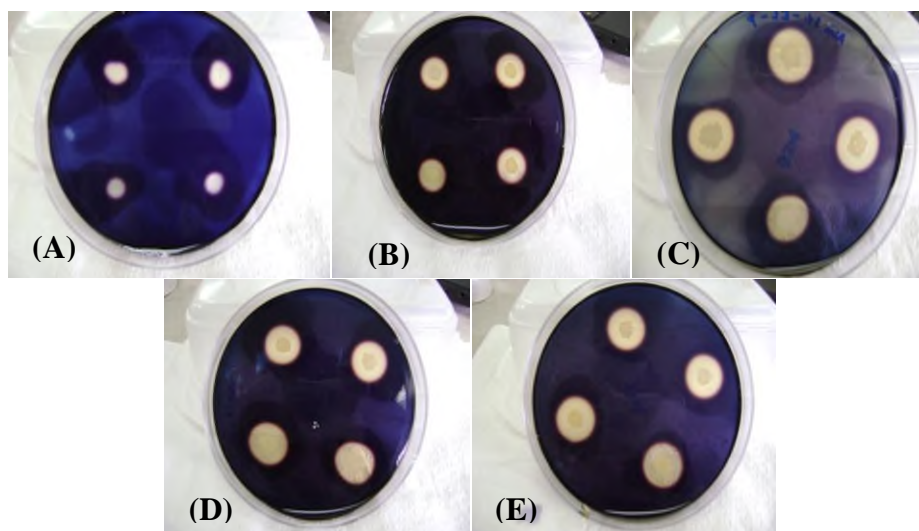


Fig. 16. Efecto de la fuente de nitrógeno de la cepa *B. amyloliquefaciens* JJC33M. **A):** MM- Alm1%; **B):** MM- Alm1% -EL; **C):** MM- Alm1%- EL- P; **D):** MM: Alm1%- EL- G; **E):** MM- Alm1%- EL- Ca²⁺.

Con base en los resultados obtenidos en esta etapa, el medio de cultivo Ca²⁺-EL-MM-Alm1% se utilizó como base para llevar a cabo la tercera y cuarta evaluación de producción de la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33).

Tercera y cuarta etapa

En la tercera y cuarta etapa de selección del medio de cultivo se observó que al agregar una fuente de nitrógeno más al medio compuesto por Ca²⁺, EL y MM enriquecido con Alm1%, la relación H:Dc disminuyó, como se muestra en la tabla 15. El diámetro de la colonia aumenta al doble con la presencia de P en el medio de cultivo y de igual forma cuando las tres fuentes de nitrógeno P, G y EL se combinan, sin embargo disminuyen la producción de la enzima y por tanto la relación H:Dc. En esos casos, el exceso de fuentes de nitrógeno en el medio favoreció la producción de biomasa por *B. amyloliquefaciens* JJC33M pero no la producción de la enzima.

Tabla 15. Tercera y cuarta etapa de la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad α -amilasa.

CEPA	TRATAMIENTO	DIÁMETRO DEL HALO* (cm)	DIÁMETRO DE LA COLONIA* (cm)	RELACIÓN H:Dc
<i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	MM-Alm1%	0.8 ± 0.05	0.4	2.00
	EL-MM-Alm1%	1.3	0.5	2.60
	Ca ²⁺ -EL-MM-Alm1%	1.5	0.5	3.00
	P- Ca ²⁺ -EL-MM-Alm1%	1.6	1.0	1.60
	G -Ca ²⁺ -EL-MM-Alm1%	1.5	0.7	2.14
	G -P-EL-MM-Alm1%	1.6	1.0	1.60
	G -Ca ²⁺ -P-MM-Alm1%	1.6	1.0	1.60
	P-G-Ca ²⁺ -EL-MM-Alm1%	1.6 ± 0.05	1.0 ± 0.05	1.60

*Algunos datos se muestran sin desviación estándar porque su valor es igual a cero.

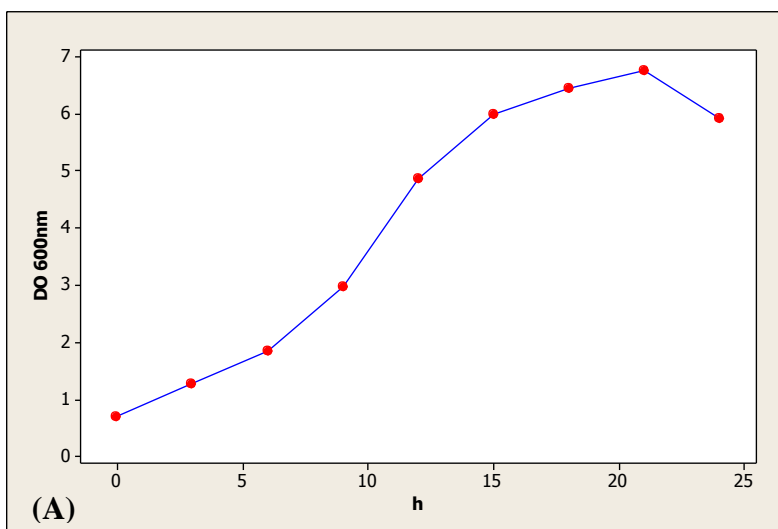
El extracto de levadura como única fuente de nitrógeno y una fuente de Ca²⁺ en combinación con MM en presencia de Alm1%, generó estadísticamente el valor más alto de la relación H:Dc (anexo V) y resultó ser el mejor medio de cultivo para la producción de amilasa por la cepa *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Es importante señalar que es necesaria la optimización del medio de cultivo propuesto para una mayor producción de la amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. La finalidad de esta parte del trabajo era únicamente incrementar la producción de la enzima para que fuera posible su caracterización. La optimización del medio de cultivo puede dar lugar a otro trabajo de tesis.

4.1.5 Curva de crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

Con base en los resultados anteriores, se determinó usar el medio de cultivo Ca²⁺-EL-MM-Alm1% con la cepa *B. amyloliquefaciens* JJC33M para la producción de amilasas. La cinética de crecimiento (fig. 14) se siguió midiendo su DO_{600 nm} y se determinó el momento de mayor producción enzimática a partir de la medición de azúcares reductores (fig. 14-B). El crecimiento se efectuó a 180 rpm y a 37°C, ya que a 30°C no se observó actividad amilolítica (datos no mostrados), asimismo diversos autores han reportado 37°C como la temperatura de producción óptima de amilasas de *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 (Gangadharan y col., 2006), *B. cereus* MK8 y *B. subtilis* MA9 (Devi y col., 2010), *Bacillus* sp. AB68 (Aygan y col., 2008), *B. licheniformis* BS1 (Vaseekaran y col., 2010). El pH

inicial del medio de producción fue de 6.7, se sabe que la producción de amilasas es muy sensible al pH inicial del medio de fermentación (Pedersen y Nielsen, 2000), pero algunas cepas como *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 producen establemente su α -amilasa a pH de entre 4.0 y 7.0, por lo que se decidió no ajustar el pH del medio de producción y esperar que el valor del pH final de dicho medio indicara el pH idóneo para la producción de AmiJ33.

Durante el crecimiento de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se observó una fase adaptación de 10h. Así mismo se estimó que el inicio de la fase de crecimiento exponencial sucedió a las 6h y concluyó a las 15h justo cuando inició la fase estacionaria, la cual marcó su término a las 21h dado que a las 24h inició la fase de muerte celular (fig. 17-A). Se notó una fase estacionaria en la concentración de azúcares reductores presentes en el medio que abarcó de las 18 a 21h de cultivo, observándose un pequeño descenso en su concentración a las 24h (fig. 17-B).



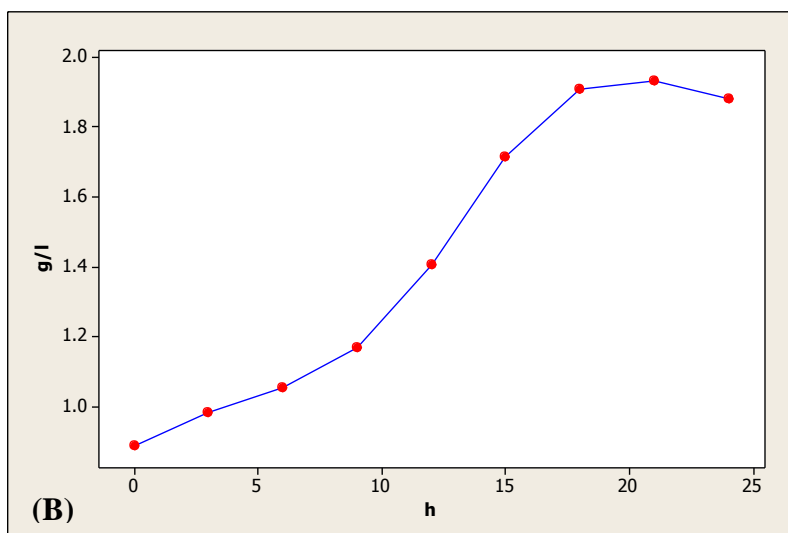


Fig. 17. Curva de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (A) y Medición de azúcares reductores presentes en el medio (B). Medio Ca^{2+} -EL-MM-Alm1%.

El aumento en la concentración de azúcares reductores presentes en el medio se puede relacionar con un aumento de la producción y de la actividad amilasa por la cepa. Entre las 15 y 21h de cultivo se alcanza la fase estacionaria, fase en la cual se ha reportado la mayor producción de amilasas para las cepas, *B. licheniformis* BS₁ y los aislados FS₁ y GS₁ (Vaseekaran y col., 2010), *Bacillus* sp.AB68 produce la máxima cantidad de enzima durante esta fase aproximadamente 20h después del inóculo (Aygan y col., 2008). Asimismo, *B. amyloliquefaciens* (Roychoudhary y col., 1989), *B. thermooleovorans* (Malhotra y col., 2000), *B. subtilis* (Baig y col., 1984; Najafi y col., 2005; Swain y col., 2006), *B. amyloliquefaciens* (Gangadharan y col., 2006) y *B. brevis* MTCC 7521 (Ray y col., 2008), presentan una máxima producción y actividad de sus amilasas en la fase estacionaria entre las 36 y 48h de cultivo.

El pH final del medio de cultivo libre de células fue de 6.9. La α -amilasa de *B. sp.* B₃ se produce a pH de 7.0 (Thippeswamy y col., 2006) al igual que las α -amilasas de *B. cereus* MK8 y *B. subtilis* MA9 (Devi y col., 2010), *B. subtilis* presenta la mejor producción de su α -amilasa a pH entre 7.5 y 8.0 (Haq y col., 2003). Sin embargo, debido a que no es parte de los objetivos de este trabajo determinar el pH óptimo de producción de AmiJ33, se tomará como primera aproximación que a valores de pH cercanos a 6.9 se obtiene la mejor producción de AmiJ33.

4.1.6 Obtención de AmiJ33

4.1.6.1 Precipitación con sulfato de amonio de AmiJ33

Tomando en cuenta que la máxima producción de azúcares reductores es directamente proporcional con la máxima producción de actividad amilasa, misma que ocurrió durante la fase estacionaria de crecimiento, se decidió parar la fermentación al término de dicha fase (24h) y recuperar la enzima (fig. 18).

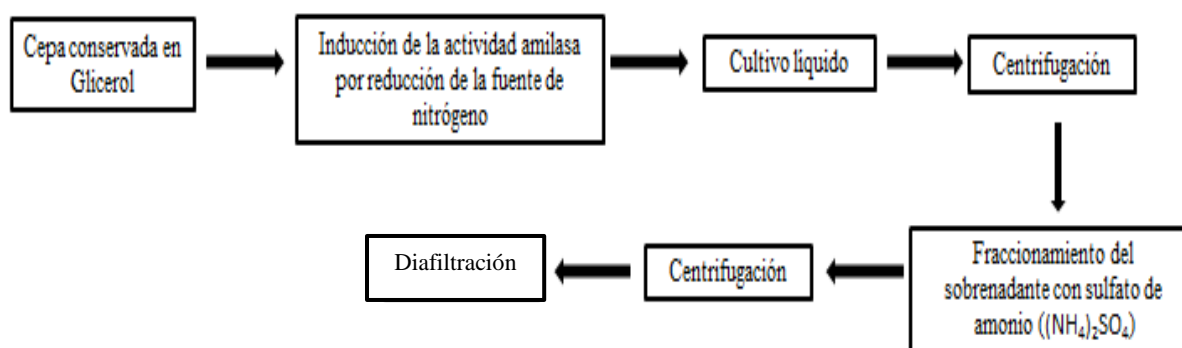
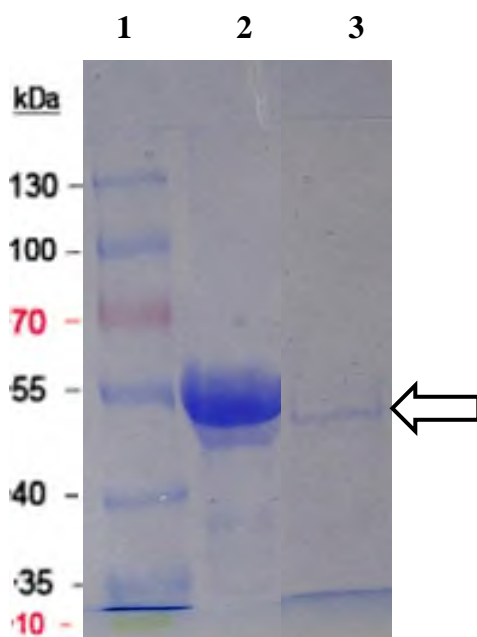


Fig. 18. Proceso de producción y recuperación de AmiJ33.

Las fracciones proteicas resultantes de la saturación con sulfato de amonio se probaron para actividad amilasa. Para ello hubo que concentrar, cada fracción proteica, 100 veces el volumen inicial del extracto crudo enzimático. La única fracción que presentó actividad amilolítica fue la saturada al 60% (F60). Diversos autores han reportado la recuperación de amilasas saturando con sulfato de amonio al 40% (Quintero y col., 2009), 50 y 80% (Shaw y col., 1995), 70 y 80% (Aygan y col., 2008; Gangadharan y col., 2008). Es posible que los diferentes porcentajes de saturación del extracto crudo enzimático con sulfato de amonio, indiquen la cantidad de aminoácidos hidrofílicos exteriores contenidos en la estructura proteica (Demirjian y col., 2001).

La fracción F60 del extracto enzimático de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se sometió a electroforesis SDS-PAGE (fig. 19), observándose una banda de 49.83kDa, la cual presumiblemente corresponde a AmiJ33. La amilasa de *B. amyloliquefaciens* es un proteína

termoestable (Rubiano, 2006) por tener aminoácidos hidrofóbicos, puentes de hidrógeno y enlaces a metales (Demirjian y col., 2001), por lo que la banda observada, debe cumplir con estas características para soportar las condiciones del reactivo de Laemmli. Se ha reportado que *Bacillus sp.*, produce una amilasa de 66kDa (Aygan y col., 2008), *Bacillus sp.* IMD 435 produce una α -amilasa de 63kDa (Hamilton y col., 1998), *B. licheniformis* produce una amilasa de 60kDa (Raíces y col., 1992) y que *B. amyloliquefaciens* produce una amilasa de 58kDa (Gangadharan y col., 2009), cuando las muestras migran en condiciones desnaturalizantes.



4.1.7 Caracterización enzimática parcial de AmiJ33

4.1.7.1 Efecto del pH y la temperatura en la actividad de AmiJ33

La actividad de AmiJ33 fue estudiada en un intervalo de pH de 4.0 a 8.0, a 50°C. La mayor actividad (0.086U/ml) bajo esas condiciones se registró a pH de 6.0 (fig.20). Entre pH 4.0 y 5.0 la enzima mostró el 72% de la actividad, disminuyó a pH 7.0 y 8.0, manteniendo el 68 y

38% de la actividad respectivamente. La mayoría de las amilasas que se conocen presentan mayor actividad a valores de pH neutro o valores ligeramente ácidos, también se sabe que la actividad disminuye rápidamente a valores de pH alcalinos (Bessler y col., 2003; Goyal y col., 2005; Teodoro y Martins 2000). Sin embargo, AmiJ33 presenta una ligera ventaja sobre las amilasas conocidas, ya que aunque a valores de pH alcalinos disminuye su actividad, a pH 4.0 mantiene el 72% de la actividad, por lo que es posible emplearla en procesos industriales bajo estas condiciones. Es necesario saber qué ocurre con la actividad de AmiJ33 a pH 3.0, valor en el que muchas amilasas no presentan actividad.

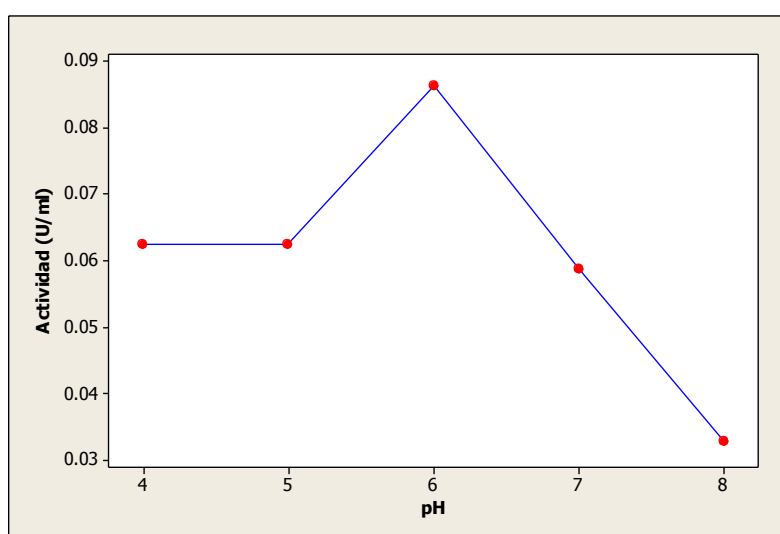


Fig. 20. Efecto del pH sobre la actividad de la AmiJ33.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33 se evaluó a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C (fig. 21), observando un aumento en la actividad enzimática a partir de los 40°C hasta los 80°C, temperatura en la cual se registró la mayor actividad de la enzima (13.056U/ml). Posteriormente, la actividad disminuyó drásticamente conforme aumentaba la temperatura, sugiriendo que entre los 90 y 100°C AmiJ33 se ha desnaturalizado, perdiendo por completo la actividad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* CUMC305 (Vasekaran y col., 2010), que presenta su mayor actividad entre 80 y 90°C, mientras que las α -amilasas de *B. sp.* BBM1 (Quintero y col., 2009), *B. sp.* AB68 (Aygan y col., 2008), *B. cereus* MK8, *B. subtilis* MA9 (Devi y

col., 2010) y *Bacillus* sp. BKL20 (Kubrak y col., 2009) presentan su máxima actividad entre los 50 y 80°C.

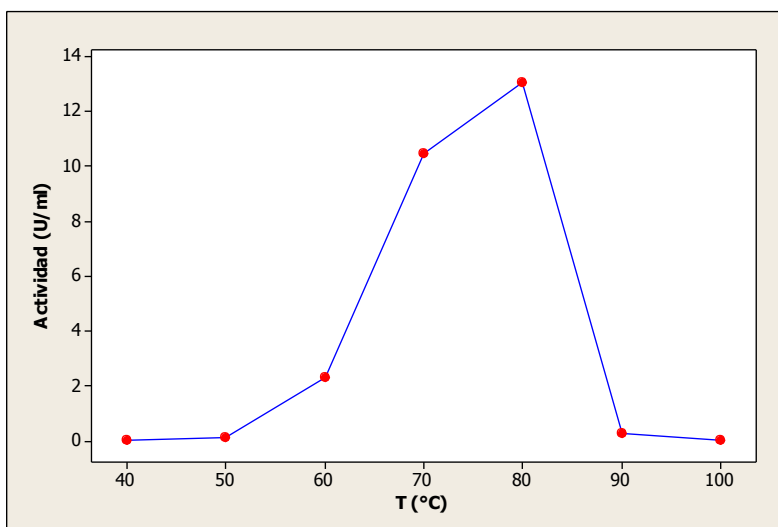


Fig. 21. Efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33.

Para una caracterización más completa de AmiJ33 es necesario evaluar la termoestabilidad de la enzima considerando el pH y la temperatura en los que se registró la mayor actividad enzimática, asimismo los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Todos esos parámetros en conjunto permitirán proponer a AmiJ33 en un sector industrial determinado. Mientras tanto, los estudios realizados en el presente trabajo servirán como base a trabajos futuros, de la misma temática, que se realicen en la región de la Cuenca del Papalopan.

CONCLUSIONES

A partir de suelos cultivados con caña de azúcar, ubicados en la región de la Cuenca del Papaloapan, con una densidad microbiana de 2.1×10^5 UFC/g de suelo se obtuvieron cuatro aislados bacterianos con actividad amilasa de la muestra con profundidad de 0-15cm. Los aislados bacterianos se identificaron como JJC31, JJC32, JJC33M y JJC33N. Solo el aislado JJC32 fue Gram negativo.

La información proporcionada por las pruebas bioquímicas y el análisis bioinformático de las secuencias del gen 16S de los cuatro aislados bacterianos, reveló que JJC31, JJC33M y JJC33N, comparten un 99% de similitud con *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535.

Se eligió la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M para producir α -amilasas, la cual mostró la mayor expresión de la enzima, en el medio compuesto por Ca^{2+} -EL-MM-alm1%, después de 24h de incubación a 37°C.

La α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) se recuperó saturando el extracto crudo enzimático al 60% con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes, se estimó su peso molecular en 50kDa aproximadamente.

AmiJ33 mostró su mayor actividad a pH 6.0 (0.086 U/ml) y a 80°C (13.056 U/ml).

Se acepta la hipótesis de este trabajo, ya que fue posible aislar bacterias con actividad amilasa de suelos cultivados con caña de azúcar en la Cuenca del Papaloapan. AmiJ33 se puede proponer para las industrias de panificación y textiles, pero debido a que su actividad cae a valores de pH alcalinos y a temperaturas superiores de 80°C, no puede ser propuesta para industrias cerveceras o de químicos para la limpieza (detergentes).

PERSPECTIVAS

- Evaluar la termoestabilidad y los parámetros cinéticos V_{max} y K_m de AmiJ33 para tener más información cinética con la finalidad de definir las condiciones de uso en la industria.
- Optimizar el medio de cultivo para incrementar la producción de AmiJ33.
- Proponer medios de cultivo para incrementar la producción de α -amilasas de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC31 y *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33N sin que se favorezca la producción de biomasa. Asimismo, caracterizar las amilasas de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC31 y *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33N para su uso potencial en la industria.
- Debido a la discrepancia en cuanto a la identificación del aislado JJC32, es necesario resecuenciar el gen 16S para identificar el aislado.

REFERENCIAS

Abdu M. M, Neelgund S, Gurumurthy D. M y Rajeshwara A. N. 2011. Identification, Characterization of Novel Halophilic *Bacillus Cereus* MS6: a Source for Extra Cellular α -Amylase. *Adv. Environ. Biol.* 5: 992-999.

Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. Second edition. Jonh Wiley & Sons, Inc. New York. 467 p.

Amemura A, Chakraborty R, Fujita M, Noumi, T y Futai, M. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomoms amyloclavata* SB-15.1. *Journal Bacteriol.* 263, 9271

Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Importación. 2010. INEGI, Capítulo 35.

Asgher M, Javaid A. M, Rahman S. U y Legge R. L. 2005. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering.* 79: 950-955

Aygan A, Arikan B, Korkmaz H, Dinçer S y Çolak Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal Microbiol.* 39: 547-553.

Baig M. A, Pazlarova J y Votruba J. 1984. Kinetics of α -amylase production in a batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *Food Microbiol.* 29: 359–364.

Balls, A.K., Walden, M.K. y Thompson, R. R. 1948. A crystalline β -amylase from sweet potatoes. *Journal Bacteriol. Cell.* 173: 9-19.

Ballschmiter M, Fu`tterer O y Liebl W. 2006. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline α -Amylase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2206–2211.

Beiyun Z y Youxia Z. 1991. Studies on properties of termostable β -amylase from *Thermoactinomyces* sp. V₄. *Journal Bacteriol. Cell.* 7: 145.

Bej A. K, M. H. Mahbubani y R. M. Atlas. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 301-334.

Ben Am, Mezghani M y Bejar S. 1999. A thermostable α -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding agent. *Enzyme and Microbial Technol.* 24: 548-9.

Bertoldo y Antranikian. 2002. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 151-160.

Bessler C, Schmitt J, Maurer K. H y Schmid R. D. 2003. Directed evolution of a bacterial α -amylase: toward enhanced pH performance and higher specific activity. *Process Biochem.* 12: 2141–2149.

Boyer y Shannon. 1987. Corn: chemistry and technology. American Association for Clinical Chem. 227-253.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Britton y Stock, 1986. Acidosis, rate of starch of digestion and intake In: AOESU. Symposium Proceedings: Feed Intake by Beef Cattle. 125-136.

Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Omer C, Ashabil A y Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38: 1397–1403.

Centro de Acción para el Desarrollo, CODICE, A.C. 2010. Seminario Agua, bosques y participación ciudadana en los Valles Centrales, Oaxaca.

Crabb W. y Mitchinson E.C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Technol. Biotechnol.* 15: 349– 352.

Demirjian D. C, Moris V. F y Cassidi C. S. 2006. Enzymes from thermophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 144-151.

Devi L. B, Khaund P. y Joshi S. R. 2010. Thermostable amylase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan Range. *African Journal of Microbiol. Res.* 23: 2534-2542.

De Pinto J. A. y Campbell L .L. 1968. Purification and properties of the amylase of *Bacillus macerans*. *Biochem.* 7: 114-120.

Díaz R. G, Gluyot J. P, Terán F, Morlon J y Wachter C. 2003. Microbial and Physiological characterization of weakly amylolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican maize fermented food. *App. Environ. Microbiol.* 69: 4367- 4374.

Diderichsen, B. y Christiansen, L. 1988. Cloning of a maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol. Letters.* 56: 53-59.

- Dewick P. M. 1997. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. Ed. John Willey and Sons. 428-447.
- El-Safey E. M y Ammar M. S. 2004. Purification and characteraization of α -amylase isolated from *Aspergillus flavus var. columnaris*. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7.
- Ezeji T. C, y Bahl H. 2006. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant a-amylase and a-glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. Journal Bacteriol. 125: 27–38.
- Fischer E. H. y Stein E. A. α -Amylases. 1960. The Enzymes, 2nd ed. vol. 4, Academic Press. 313-343.
- Flores M. C, López N. J. C y Valencia J. A. 2005. α -Amylase activity from the entomopathogenic fungus *Beauveriu hatisiaza* growing in liquid medium. Rev. Colomb. Entomol. 31.
- Fogarty y Kelly. 1980. Amilasas, amiloglucosidasas y glucanasas relacionadas. Enzimas microbianas y bioconversión. Academic Press.
- Foosi B. T, Tavea F. y Ndjonken R. 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal Bacteriol. 4: 14-18.
- Francis F, Sabu A, Nampoothiri K. M, Szakacs G y Pandey A. 2002. Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. Journal Biol. Mol. 42: 320–326.
- French, D. 1960. The Enzymes β -Amylases, 2nd ed. vol. 4, Academic Press, New York. 345-368.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylose as the substrate. Biochem. 41: 583–603.
- Ganghadaran D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri K. M y Pandey A. 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for α -amylase production. Food Technol. Biotechnol. 44: 269-274
- Gangadharan D, Nampoothiri K. M, Sivaramakrishnan S y Pandey A. 2009. Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. App. Biochem. Biotechnol. 158: 653–662.
- Gautam S. P, Gupta A, Hasija S. K, y Kekre S. 1991. Production and properties of Ci. And 13 amylases from *Phaffia rhodozyma* and *Brettanomyces naardensis*. Indian Journal Microbiol. 31: 431.

- Goyal N, Gupta J. K y Soni S. K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technol.* 37: 723–734.
- Grootegoed J. A, Lauwers, A. M y Heinen W. 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Arch. Microbiol.* 90: 223.
- Guillen D, Moreno M. S y Rodriguez S. R. 2009. Microorganismos y Virus: Herramientas Clave para el Desarrollo de Vacunas. *Biotecnología.* 13.
- Hamilton L. M, Kelly C. T y Fogarty W. M. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Process Biochem.* 21: 111-5.
- Hamilton L. M, Kelly C. T, y Fogarty W. M. 1998. *Carbohydrate Res.* 314: 251–257.
- Harada H, Oyaizu H. y Ishikawa H. 1996. A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora. *Journal of General and App. Microbiol.* 42: 17-26
- Haq I, Ashraf H, Iqbal J y Qadeer M. A. 2003. Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technol.* 87: 57–61.
- Higashihara M y Okada S. 1974. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* No. 32. *Agric. Biol. Chem.* 38: 1023.
- Hirata A, Adachi M, Sekine A, Kang Y. N, Utsumi S y Mikami B. 2004. Structural and enzymatic analysis of soybean β -amylase mutants with increased pH optimum. *Journal Biol. Chem.* 279: 7287–7295.
- Horváthová V, Janeček S y Sturdík E. 2001. Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 20: 7-32.
- Huntington. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bun. *Journal Anim. Sci.* 75: 852-867.
- Hyun H. H y Zeikus J. G. 1985. General biochemical characterization of thermostable extracellular β -amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*. *App. Environ. Microbiol.* 49: 1162.
- Imrice F. K y Tilbury R. H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. *Sugar. Technol. Rev.* 1: 291-361.
- Jeanningros R, Creuzet-Sigal, N, Frixon C y Cattaneo J. 1976. Purification and properties of a debranching enzyme from *Escherichia col.* *Biochimica et Biophys. Acta Enzymol.* 438: 186

- Kainuna K, Kobayashi S y Harada T. 1978. Action of *Pseudomonas* isoamylase on various branched oligo- and poly-saccharides. *Carbohydrate. Res.* 61: 345-357.
- Kainuma K, Wako K, Kobayashi A, Nogami A y Suzuki S. 1975. Purification and some properties of a novel maltohexaose-producing exo-amylase from *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica et Biophys. Acta Enzymol.* 410: 333-346.
- Katsuka Y, Mezaki Y, Kubota M y Matsuura Y. 1998. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *Journal of Mol. Biol.* 281: 885-897.
- Kelly J. J y Alpers D. H. 1973. Properties of human intestinal glucoamylase. *Biochimica et Biophys. Acta Enzymol.* 315: 113-122.
- Kilara A, Desai M, Branen A. L, Davidson P. M, Salminen S y Thorngate J. H. 2002. Enzymes In: *Food Additives*. Third Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA. 661–706.
- Kirk O, Borchert T. V y Fuglsang C. C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:345-51.
- Kofod D. 2005. Patent 5723328. 446-660
- Kubrak O. I, Storey J. M, Storey K. B y Lushchak. 2009. Production and properties of α -amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Journal Microbiol.*
- Kuriki T, Hondoh H y Matsuura Y. The conclusive proof that supports the concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Biol. Bratislava.* 60: 13–16.
- Kwan H. S, So K. H, Chan K. Y, y Cheng, S. C. 1994. Purification and properties of β -amylase from *Bacillus circulans* S31. *World Journal Microbiol and Biotenchnol.* 10: 597.
- Latorre García, L. 2008. Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces Cerevisiae* *vs* *Diastaticus*. Universidad De Valencia España.
- Machius M, Declerck N, Huber R, y Wiegand G. 1998. *Structure.* 6: 281–292
- Malhotra R, Noorwez S. M y Satyanarayana T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium independent α -amylase of extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *App. Microbiol.* 31: 378–384.
- Manners D. J. Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. 1962. *Adv. in Carbohydrates Chem.* 17: 371-430.
- Meade G. P y Chen J. P. 1977. Sugar cane handbook. 10 ed. W. I. P. John Willey and Sons. 947.

- Mendu D. R, Ratnam B. V. V, Purnima A y Ayyanna C. 2005. Affinity chromatography of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Environ. Microbiol. Technol. 37: 712–717.
- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Mitsuiki S, Mukae K, Sakai M, Goto M, Hayashida S, y Furukawa K. 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains. Environ. Microbiol. Technol. 37: 410–416.
- Mikami B, Degano M, Hehre E. J y Sacchettini J. C. 1994. Crystal structures of soybean β -amylase reacted with β -maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis. Biochem. 33: 7779-7787.
- Mikami B. 2000. Structure of β -Amylase: X-ray Crystallographic Analysis In: Glycoenzymes. Japan Sci. Societies Press. 55-81.
- Mikami B, Iwamoto H, Malle D, Yoon H. J, Demirkan-Sarikaya E, Mezaki Y y Katsuya Y. 2006. Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. Journal Mol. Biol. 359: 690-707.
- Mizuno M, Tonozuka T, Uechi A, Ohtaki A, Ichikawa K, Kamitori S, Nishikawa A y Sakano Y. 2004. The crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA II) complexed with transglycosylated product. European Journal Biochem. 271: 2530-2538.
- Najafi M. F, Deobagkar D y Deobagkar D. 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Prot. Exp. and Pur. 41: 349-354.
- Nanmori T, Numata Y y Shinke R. 1987. Aislamiento y caracterización de *Bacillus cereus*, cepa mutante hiperproductiva de β -amilasas. App. Environ. Microbiol. 53: 768.
- Nakakuki T, Azuma K y Kainuma K. Action patterns of various exo-amylases and the anomeric configurations of their products. 1984. Carbohydrate. Res. 128: 297-310.
- Nielsen, J. E y Borchert, T. V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. Biochimica et Biophys. Acta Prot. Struc. and Mol. Enzymol. 1543: 253–274.
- Nishiwaki H, Ito K, Shimomura M, Nakashima K, Kawamura T y Matsuda K. 2006. Association of insecticidal microorganisms with larvae of Myrmeleon bore. Bioresource Technol. 3327-204
- Nogales, 2005. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. Extremophiles. 1:2-13.

- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ito S. y Miki K. 2003. Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. *Journal Biol. Chem.* 278: 24818–24824.
- Obi S. K. C y Odibo F. J. C. 1984. Partial purification and characterization of a thermostable *actinomycetes* β -amylase. *App. Environ. Microbiol.* 47: 571
- Odibo F. J. C, Okafor N, Tom M. V y Oyeka C. A. 1992. Purification and characterization of a beta-amylase of *Hendersonula toruloidea*. *Starch.* 44.
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS), 2005. Tarjeta distrital de información estadística básica. Distrito 06 Tuxtepec. Oaxaca, México.
- Øvreås, L. y Torsvik, V., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Cur. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Øvreås, L. y Torsvik, V., 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial. Ecol.* 36: 303-315.
- Pujadas G y Palau J. 1999. TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biol. Bratislava.* 54: 231-254
- Pandey A, Nigam P, Soccol C. R, Soccol V. T, Singh D y Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. App. Biochem.* 31: 135-152.
- Pedersen H y Nielsen J. 2000. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *App. Microbiol. Biotechnol.* 53: 278–281.
- Prasanna V. A. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnol.* 4: 1525-1529.
- Polaina J. 2004. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *Mensaje Bioquímico.* 38: 137-188
- Quintero M. M, Montoya C. O. I y Gutiérrez S. P. A. 2010. Purification and characterization of a α -amylase produced by *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna.* 77: 3138.
- Raíces M, Madrazo J, Margolles E y Cremata J. 1992. Procedimiento para la purificación de una α -amilasa bacteriana en *E. coli*. *Biocnología Aplicada.* 9: 186-191.
- Ramachandran S, Patel A. K, Nampoothiri K. M, Chandran S, Szakacs G, Soccol C. R y Pandey A. 2004. α -amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Bioresource Technol.* 47: 309–317.
- Rani R. R y Nanda G. 1996. Microbial β -amylases: Biosynthesis, characteristics, and industrial application. *Crit. Rev. in Microbiol.* 22: 181-199.

Ray R. R y Nanda G. 1996. Microbial β -amilases: Biosynthesis, characteristics, and industrial applications. Crit. Rev. in Microbiol. 3: 181-199.

Ray R. R, Jana S. C y Nanda G. 1994. Saccharification of indigenus starches by β - amylase from *Bacillus megaterium*. World Journal Mol. Biol.

Ray R. C, Kar S, Nayak S y Swain M. R. 2008. Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. Food. Biochem. 22: 234–246.

Robyt J. F. y Ackerman R. J. 1971. Isolation, purification, and characterization of a maltotetraose-producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Biochem. Biophys. 145: 105-114

Royo R. R, Mendoza G. D, Gonzales M, Suárez O, Bárcena G, y Landois P. 2000. Digestibilidad *in situ* y respuesta productiva de borregos alimentados con dietas basadas en grano de sorgo tratado con amilasas. Asociación Mexicana de Producción Animal. 205-208

Roychoudhary R. S, Parulekar S. U. J y Weigand W. A. 1989. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. App. Microbiol. 33: 197–206.

Rubiano L. C. 2006. Aisamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios, lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiles termominerales de Paipa e Iza (Boyacá). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

Rudiger A, Jorgensen P. L y Antranikian G. 1995. Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. App. Environ. Microbiol. 61: 567–575.

Salton M. J. R y Kim K. S. 1996. Structure in: Baron's Medical Microbiology. Fourth ed. Universit of Texas Medical Res. 12: 1-1.

Santos E, y Martins M. L. L. 2003. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Arch. Biol. Technol. 46: 129–134.

Saxena R.K, Dutt K, Agarwal L y Nayyar P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. Bioresource Technol. 2: 260–265.

Schwimmer S y Balls A.K. 1949. Isolation and properties of crystalline α -amylase from germinated barley. Journal Biol. Chem. 179: 1063-1074.

Siggins. 1987. Molecular cloning and characterization of β -amylase gene from *Bacillus circulans*. Mol. Microbiol. 1-86.

Shaw F. J, Lin F. P, Chen S. C y Chen H. C. 1995. Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. Bot. Bull. Acad. Sin. 36: 195-200.

Sheen G. J, Saha B. C, Lee Y, Bhatnagar L y Zeikus J. G. 1988. Purification and characterization of a novel thermostable β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. App. Environ. Microbiol. 254: 835.

Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Nakamura L. K, Komagata K. 1997. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. Inter. Journal System. Evol. Microbiol. 47: 299-306.

Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri K. M, Soccol C. R y Pandey A. 2006. α -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments. Food Technol. Biotechnol. 44: 173-184.

Smith B. W y Roe J. H. 1949. A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. Journal Biol. Chem. 179: 53-59.

Smith R. L. y Smith T. M. 2000. Ecología 4ª Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid.

Souza T. C. E y Leal M. M. L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal Microbiol. 31: 298-302

Sumner J. B y Howel S. 1935. A method for determination of saccharase activity. Journal Bacteriol. 108: 51-54

Swain M. R, Kar S, Padmaja G y Ray R. C. 2006. Partial characterization and optimization of production of extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. Microbiol. Res. 55: 289-296.

Takasaki Y. 1976. Purification and enzymatic properties of β - amylase and pullulanase from *Bacillus cereus mycoides*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 40: 1523

Teodoro C. E. D, y Martins M. L. L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal Microbiol. 31: 298-302.

Thippeswamy S, Girigowda K y Mulimani V. H. 2006. Isolation and identification of amylase producing *Bacillus* sp. From dhal industry waste. Inter. Journal System. Evol. Microbiol. 43: 295-298.

Thomas M, Priest F. G y Stark J. R. 1980. Caracterización de una β -amilasa extracelular de *Bacillus megaterium*. Journal Gral. Microbiol. 118-167.

Torres J. S. 2006. Manejo del cultivo en condiciones de caña verde. Cali, Cenicaña. Serie técnica. 35: 165.

Turner P, Mamo G. y Karlsson E. N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microbial Cell Factories. 6: 9.

Urlaub H y Wijber G. 1975. Identification of isoamylase a glycogen-debranching enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens*. Biochim. Biophys. Acta . 57: 1.

Van der Maarel M, Van der Veen B, Uitdehaag H, Leemhuis H y Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. Journal Biotechnol. 94: 137–55.

Van Lenen J. M y Smith M. B. 1968. US Patent 3, 418, 211.

Van Loon E. J, Likins M. R y Seger A. J. 1952. Photometric method for blood amylase by use of starch–iodine color. American Journal Clin. Pathol. 22: 1134–1136.

Vaseekaran S, Balakumar S y Arasaratnam V. 2010. Isolation and identification of a bacterial btrain producing thermostable α -amylase. Tropical Agricultural Res. 22: 1-11.

Vihinen M y Mantsala P. 1989. Microbial amylyolytic enzymes. Biotech. Lab. 24: 329- 418.

www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cBacillus+amyloliquefaciens%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Bacillus+amyloliquefaciens&redir=1

www.alimentos-press.com

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

www.ebi.ac.uk

www.enzymeinchina.es/9-pullulanase.html

www.genome.jp/dbget-bin/get_htext?ECTable

www.lallemamdexico.com/pdf/LBU-01-14.pdf

www.manualdelombricultura.com/manual/index.html

www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC27/6.html

www.rcsb.org/pdb/results/results.do?outformat=&qrid=15187823&tabtoshow=Current

Xiao Z, Storms R y Tsang A. 2006. A quantitative starch– iodine method for measuring α -amylase and glucoamylase activities. Anal. Biochem. 351: 146–148.

Xu D y Coté J. C. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S23S ITS nucleotide sequences. Inter. Journal System. Evol. Microbiol. 53: 695-704.

Yuen T. 1974. A Double Buffer Method for the Determination of Lime Requirement of Acid Soils. *Food. Technol.* 55: 233

Zhang Q, Tsukagoshi N, Miyashiro S y Udaka S. 1983. Increased production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *App. Environ. Microbiol.* 46: 1

ANEXOS

I. Secuencias del gen 16S

> *B. amyloliquefaciens* JJC31

CACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC AAGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATG
 CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGG
 ATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
 GATTTGACGTACATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGAT
 CAARGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCcAACATYTCACGACACGAGCTGACGRCAACCATGCACCACCTGTCAMTYT
 (GCCCCcGAAGGGGACGTCTATCThCTAGGAWTGTACAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA
 TTA AACACMcTGSiTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCcAGGCG
 GAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA
 CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTG
 GTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGTACACGTGGAATTCCACTCTCTCTTCGCACTCAAGTTCCCCAGTTTC
 AATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAAATTC
 GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACC GCGGTGCTGGCAGTTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAGTACCGTCAAGGT
 GCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTiCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGc
 TCCGTGAGAcTTiCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG
 GCCGATCACCTCTCAGGTGGCTACGCATCGTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTC
 CATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTC
 CCGGAGTTATCCCA

> *P. amylolyticus* JJC32

CCACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCG
 ATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGT
 CGTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTT
 CCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCG
 GGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCGGAAGGCACCAAWCC
 ATCTCTGSWAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA AACACATGTCCACCGCTT
 GTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTAACTTGGCGCCGTA CTCCCCAGGCGGTGCACTTAACGCGTTAGCTCCGG
 AAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC
 CCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTT
 ACCGCTACACTGGAATTTACCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGG
 GATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTAC
 CGCGGTGCTGGCAGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGCGGGTAACGTC AATCGMYAAGGTTATTAACYTCATcRCCTCC
 TCCCCGTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTCATAcCGCGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCA
 ATATTTCCCACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCTCTCAGACCAGCTA
 GGGATCGTCGCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCGAAG
 GTCCCCCTTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCA
 GACATTACTACCCG

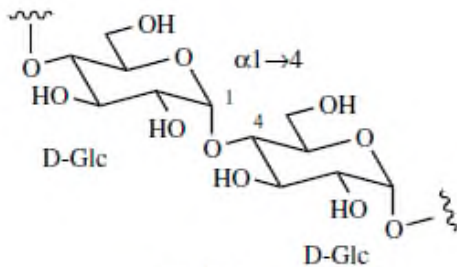
> *B. amyloliquefaciens* JJC33M

GCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA
CGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACT
GAGAACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAG
GTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTgTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG
AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCM
TGCACCACCTGTCACTYTGCCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGSTCCACCCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTCAGTCTTGCAGCCG
TACTCCCCcAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGAAACCCCTAACMMTTAGCACTCATCGTT
TACGGCTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGT
CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTTCTGCACTCAA
GTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCCGCTGCGAGCCCTTA
CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTtCTGGTTA
GGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC
TCACGCGCGTGTGCTCCGTCAgAMTTTCGYCCATTGCGGAAGAWTCCcTAMTGcTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT
CTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTACGCATCTGCGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
AATGCGCCGCGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGT
ATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCC

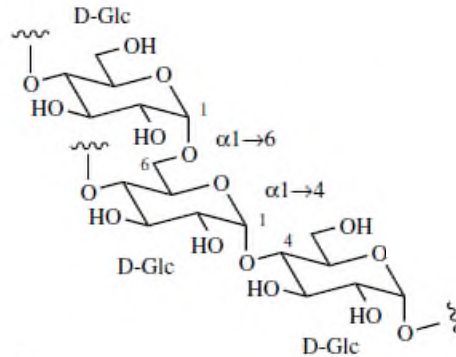
> *B. amyloliquefaciens* JJC33N

CCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGT
ATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAG
AACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCAMGtGTGTAGcCCCAGGTC
ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAAT
GCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATYTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC
aACCACCTGTCACTYTGCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTC
GCGTTGCTTCGAATTAACCACMTGSiTCCACCCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGT
ACTCCCCcAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTA
CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG
CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTTCTGCACTCAAGT
TCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCCGCTGCGAGCCCTTACG
CCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTtCTGGTTAGG
TACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
AMGCGCGGTTGCTCCGTCAGAcTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCcTACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGTACGCATCTGCTGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATT
AGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCGGCTAACATCAGG
AGC

II. Estructuras de los sustratos y productos de las amilasas



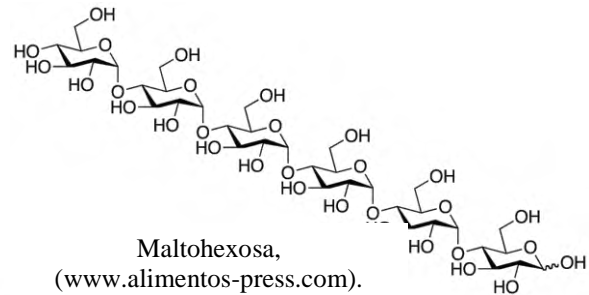
Estructura parcial de una molécula de amilosa compuesta por 1000-2000 unidades de glucosa, (Dewick, 1997).



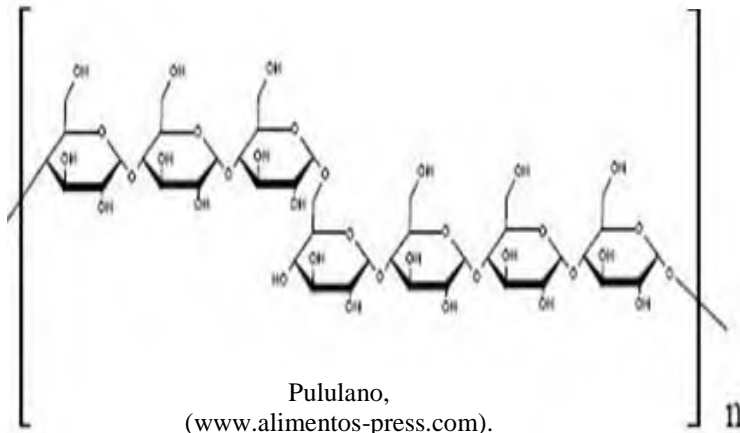
Estructura parcial de una molécula de amilopectina compuesta por 10^6 unidades de glucosa, (Dewick, 1997).



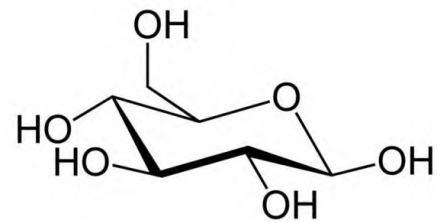
Maltotriosa, (www.alimentos-press.com).



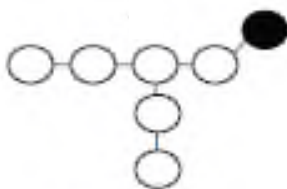
Maltohexosa, (www.alimentos-press.com).



Pululano, (www.alimentos-press.com).



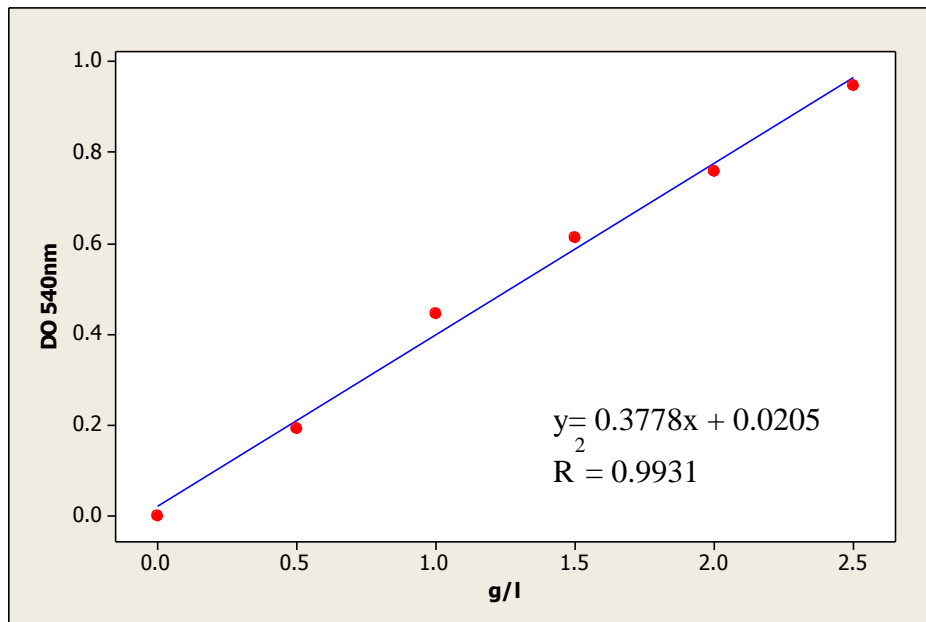
Glucosa, (www.alimentos-press.com).



Dextrina límite, (Shida y col., 1997).
Los círculos indican una unidad de glucosa.

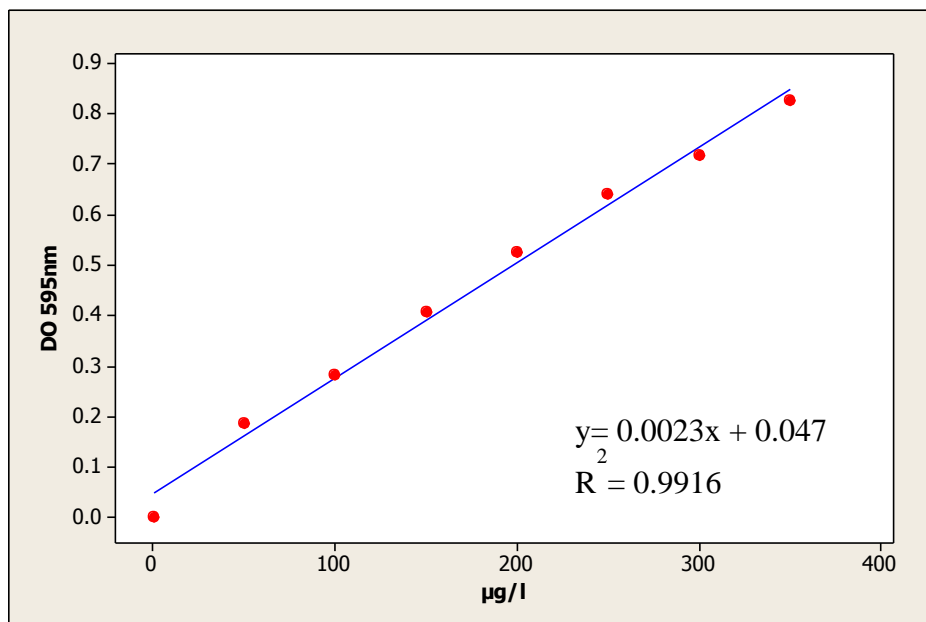
III. Curvas de calibración

Curva patrón de glucosa



Curva patrón de glucosa, DNS (Miller, 1959).

Curva patrón de BSA



Curva patrón de BSA, (Bradford, 1976).

IV. Tabla de características morfométricas de los suelos

Tipo	Características
Entisol	Dominan los materiales inorgánicos; ausencia de horizontes bien definidos en suelos de inundación y suelos rocosos.
Vertisol	Suelos arcillosos y oscuros que muestran fracturas anchas y profundas al secarse.
Inceptisol	Textura más fina que la arena margosa; escasa translocación de las arcillas; poco espesor; desarrollo moderado de los horizontes.
Aridisol	Seco durante periodos largos; pobre en humos; rico en bases; suele tener horizontes de carbonato, yeso y/o arcilla.
Mollisol	Horizontes superiores de color pardo hasta negro, con una consistencia blanda; rico en bases en regiones semihúmedas.
Espodosol	Rico en hierro y aluminio que pueden extraerse.
Alfisol	Humus a poca profundidad; traslocación de la arcilla; horizontes bien desarrollados.
Ultisol	Con lavado intenso; traslocación de la arcilla; pobre en bases en climas húmedos y cálidos.
Oxisol	Suelos con una meteorización intensa; rojos, amarillos o grises; ricos en caolitina, óxidos de hierro y usualmente también en humus en zonas tropicales y subtropicales.
Histosol	Muy rico en materia orgánica.
Andisol	Desarrollado a partir de material volcánico; meteorización débil; capas superiores de color oscuro; densidad reducida.

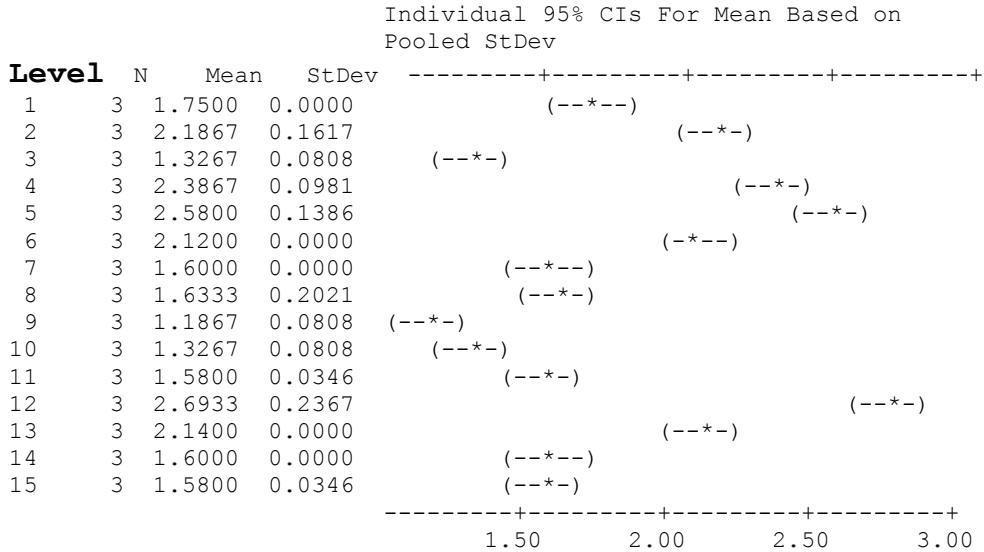
Tabla de características morfométricas de los suelos, (Smith y Smith, 2000).

V. Prueba de medias de Tukey

One-way ANOVA: H:Dc versus trat

Source	DF	SS	MS	F	P
trat	14	9.3532	0.6681	57.65	0.000
Error	30	0.3477	0.0116		
Total	44	9.7009			

S = 0.1077 R-Sq = 96.42% R-Sq(adj) = 94.74%



Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of trat

Individual confidence level = 99.91%

Level	Medio
1	G
2	P
3	G-P
4	EL
5	G-EL
6	P-EL
7	G-P-EL
8	Ca ²⁺
9	G-Ca ²⁺
10	P-Ca ²⁺
11	G-P-Ca ²⁺
12	EL-Ca ²⁺
13	G-EL-Ca ²⁺
14	P-EL-Ca ²⁺
15	G-P-EL-Ca ²⁺



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 12 de Abril del 2013 a las **16:00 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 de amilasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar** presentado por el alumno **Juan José Montor Antonio**, con número de matrícula **07060012**, 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 12 de Abril del 2013.

ATENTAMENTE,
LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura
Profesor-Investigador UNPA

Presidente

Dra. Doiores Reyes Duarte
Profesor-Investigador UAM-Cuajimalpa

Vocal

Dra. Angélica Avila Fernández
Profesor-Investigador UIAT

Co-director de Tesis

Dra. Laura Patricia Ramirez Coutiño
Profesor-Investigador UNPA

Secretario

Dr. Oscar Nuñez Guana
Profesor-Investigador UNPA