



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UNA α -AMILASA TERMOESTABLE AISLADA A PARTIR DE LA BACTERIA TERMOTOLERANTE *Bacillus licheniformis* LB04 EN AUSENCIA DE IONES Ca^{2+}

Anaid Silva, Melissa Rodríguez, Allan Blanco*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología, Ave. Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México, C.P. 66455.
edgar.blancogmz@uanl.edu.mx

Palabras clave: α -amilasas, almidón, termoestabilidad.

Introducción. Las amilasas son glicohidrolasas capaces de degradar carbohidratos complejos. Tienen alta importancia industrial en rubros como el alimentario, textil, farmacéutico, limpieza y energético (1). Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) son endo-amilasas, que hidrolizan los enlaces glucosídicos α -(1,4) en el almidón, generando productos de bajo peso molecular, como la glucosa, maltosa y unidades de maltotriosa (2). El sector industrial demanda la investigación de microorganismos termotolerantes productores de amilasas, buscando que presenten termoestabilidad, estabilidad ácida e independencia de calcio, debido a la falta de versatilidad que presentan las actuales α -amilasas comerciales (3,4). Microorganismos termotolerantes adaptados a ambientes con habituales cambios de temperatura, como el caso de *Bacillus licheniformis* lb04, son capaces de generar enzimas versátiles, capaces de mantener altos niveles de actividad enzimática (5).

Objetivo: Determinar la actividad enzimática específica que presentan las α -amilasas producidas por *Bacillus licheniformis* lb04 en ausencia de iones Ca^{2+} y temperaturas mayores a 60 °C.

Metodología. Para la bacteria *Bacillus licheniformis* lb04, se determinó su cinética de crecimiento (620 nm) bajo condiciones de 28 °C/150 rpm durante 144 hrs, en un medio con almidón como fuente principal de carbono (6). Para la detección de la actividad enzimática de la bacteria se realizó una purificación por cromatografía de intercambio iónico, eluidas con un buffer de acetato (20 mM). Las fracciones recolectadas fueron analizadas por el método de Bradford para detección de proteínas (540 nm) y después se midió la actividad específica con el sustrato específico para α -amilasa, el compuesto 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriosa (CNP-G3), por espectrofotometría (405 nm).

Resultados. La fase exponencial de *B. licheniformis* lb04 abarca desde las 0 hasta las 72 horas de crecimiento (Fig. 1). A partir de un cultivo de 24 horas, se recolectaron 10 fracciones durante la separación cromatográfica por intercambio iónico. De las 10 fracciones recolectadas, 6 reportaron presencia de proteínas (Tabla 1). Las fracciones donde se detectó mayor presencia de proteínas fueron las fracciones F3-F5 y F8-F10. Posteriormente, se analizaron con el sustrato CNP-G3, midiendo la liberación de 2-cloro, 4-nitrofenil (Tabla 2). La fracción con mayor actividad fue la F5, con 48.3 U mg^{-1} . Una unidad de actividad enzimática específica fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 mg de 2-cloro, 4-nitrofenil por minuto a pH 7.0 y temperatura 65 °C.

Conclusiones. La bacteria *B. licheniformis* lb04 presenta hasta 48.3 U mg^{-1} a 65 °C en completa ausencia de iones Ca^{2+} durante el proceso de hidrólisis enzimática.

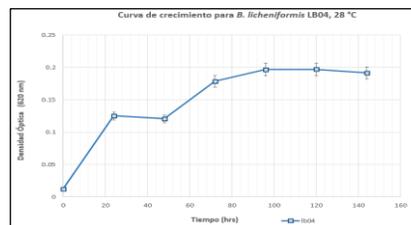


Fig. 1. Curva de crecimiento para *B. licheniformis* lb04 a 28°C/150 rpm, por 144 horas. Fase exponencial de 0 a 72 horas.

Tabla 1. Concentración de proteínas por fracciones recolectadas a través de intercambio iónico.

Fracciones	Concentración (mg/mL)	Fracciones	Concentración (mg/mL)
F1	0.00	F6	0.00
F2	0.01	F7	0.00
F3	0.12	F8	0.04
F4	0.05	F9	0.08
F5	0.04	F10	0.05

Tabla 2. Actividad específica para las fracciones recolectadas

Fracciones	Actividad específica (U mg^{-1})	Fracciones	Actividad específica (U mg^{-1})
F1	N.D	F6	N.D
F2	N.D	F7	N.D
F3	11.8	F8	45.4
F4	47.9	F9	28.8
F5	48.3	F10	37.0

Agradecimientos. Se agradece al CONACyT, a la UANL-FCQ y al instituto UANL-CIBYN por las becas, fondos, equipos e instalaciones otorgadas para la realización del presente trabajo.

Bibliografía.

- Corral M. *et al.* (2017) Bacterial nanocellulose as a potential additive for wheat bread *Food Hydrocoll.* 67:189–196.
- Goesaert H. *et al.* (2009) Amylases and bread firming – an integrated view *J. Cereal Sci.* 50(3):345–352.
- Santorelli M. *et al.* (2016) Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica* *Int. J. Biol. Macromol.* 92:174–184.
- Du R. *et al.* (2018) Purification and characterization of novel thermostable and Ca^{2+} independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072 *Int J BiolMacromol* 115:1151-1156.
- Blanco de la Cruz L. (2016) *Oxidación Microbiana del Glicerol por microorganismos Termotolerantes Aislados del Noreste de México* (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Liu X & Xu Y. (2008) A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization *Bioresour. Technol.* 99(10):4315–4320.

