



PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA CGTasa PRODUCIDA POR *Bacillus megaterium* UTILIZANDO ALMIDÓN DE AMARANTO COMO SUBSTRATO.

Maria Belem Arce Vazquez, Nayeli Barrón Álvarez, Jennifer López Sánchez y Jorge Soriano Santos
Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Biotecnología, Área de macromoléculas. México D.F., 09340.
e-mail: mariabelem_212@yahoo.com.mx.

Palabras clave: Purificación parcial, CGTasa, *Bacillus megaterium*.

Introducción. La producción mundial de las ciclodextrinas ha ido en aumento en los últimos años, debido a sus diversas aplicaciones por la capacidad de hacer complejos de inclusión con compuestos orgánicos (1). Este sector emplea CGTasa que toma como sustrato el almidón de maíz con alto contenido de amilosa (20-25%). Recientemente se han realizado diversos trabajos que buscan nuevas fuentes de almidón, esto con el fin de utilizarlo como sustrato que se empleen en la producción eficiente de CGTasa y ciclodextrinas (2).

El objetivo del presente trabajo fue emplear almidón de amaranto (AA) para utilizarlo como sustrato de *Bacillus megaterium* para la obtención y purificación de CGTasas

Metodología. Se obtuvo la CGTasa por medio de una fermentación sumergida. La actividad enzimática se evaluó mediante la producción de β -CD por el método de Fenilalanina. La purificación de la enzima se realizó en 2 etapas. Primero se realizó una precipitación del sobrenadante por medio de saturación con sulfato de amonio al 50%, 75% y 90%. Posteriormente se pasó por una columna Sephadex G-200. Finalmente se evaluó su peso molecular aparente mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%.

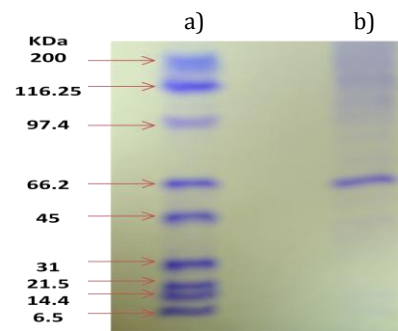
Resultados. El AA es un sustrato que estimula la producción de CGTasa al exterior del medio. A medida que se fue purificando la CGTasa fue incrementando la actividad específica hasta purificarla 7 veces con una actividad de 688.66 U/mg con una recuperación del 21%. Kitahata (1974)(3), obtuvo hasta un 50% de rendimiento de una CGTasa obtenida de *Bacillus sp.* (5 etapas de purificación), con aproximadamente la mitad de actividad específica encontrada en la CGTasa del presente estudio.

Tabla 1. Purificación de CGTasa producida por *B. megaterium*.

Etapas de purificación	Actividad enzimática (U mL ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Actividad específica (Umg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Purificación
Sobrenadante	57.75±3.3	0.59±0.010	97.88	100	1.00
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ /Dializado	29.7±1.5	0.13±0.010	228.46	51.43	2.33
Columna Sephadex G-200	13.18±0.94	0.02±0.008	659.00	22.82	6.73
Dializado/Liofilizado	12.36±1.2	0.018±0.001	688.66	21.40	7.01

La enzima purificada dio una sola banda de proteína por SDS-PAGE. Se estimó un peso molecular aparente de 66 KDa (Figura 1), este valor es muy cercano a lo establecido de 68.2 KDa por Pishtyski (2008)(4) a partir de *B. megaterium*, sin embargo otros autores han reportado diversos pesos moleculares según el tipo de microorganismo que la produce, 69, 75, y 76KDa por *Bacillus sp.* (5).

Fig. 1. Perfil electroforético de: a) Estándar proteico b) CGTasa purificadas de *B. megaterium*, empleando como fuente de carbono AA.



Conclusiones. Como resultado de este estudio se comprobó que el almidón de amaranto tiene un gran potencial para la producción de CGTasa, y se puede considerar como una alternativa eficiente para la producción de β -CD por lo que se ofrece una opción para sustituir o reemplazar a los almidones convencionales utilizados para este fin.

Agradecimiento. Se agradece al apoyo brindado por CONACyT, por la beca otorgada para el desarrollo de la tesis doctoral.

Bibliografía.

- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046
- Alves-Prado, H., Carneiro, A., Pavezzi, F., Gomes, E., Boscolo, M., Franco, C., & Da Silva, R. (2008). Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, (pp. 123-133): Springer
- Kitahata S., Tsuyama N. & Okada S. (1974). Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus Species*. *Agr. Biol. Chem.* 38 (2). 387-393.
- Pishtyski, I., et al. (2008). "Characterization of cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus megaterium*." *Applied biochemistry and biotechnology* 144(3): 263-272.
- Cao, X., Jin, Z., Wang, X., & Chen, F. (2005). A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Research International*, 38(3), 309-314.