

ACTIVIDAD HIDROLÍTICA A BAJAS TEMPERATURAS DE LAS AMILASAS PRODUCIDAS POR LA ESPECIE TERMOESTABLE *Bacillus licheniformis* LB05.

Anaid Silva, Allan Blanco*

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

Palabras clave: amilasas, almidón, termoestabilidad.

Introducción. El almidón es un polisacárido compuesto por amilosa y amilopectina. La hidrólisis de este compuesto requiere de la acción de las enzimas amilasas: α -amilasa (EC 3.2.1.1), β -amilasa (EC 3.2.1.2) y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), produciendo glucosa y maltosa (1). Las amilasas se emplean en diversas industrias como la de detergentes, textil, papel, etc. Las enzimas adaptadas al frío presentan la ventaja de necesitar menores temperaturas para su trabajo óptimo, reduciendo los costos de procesos (2). La termoestabilidad enzimática que brindan estas proteínas permite detener las reacciones en base al aumento de temperatura en la reacción, en lugar de alterar la mezcla de reacción (3). Los microorganismos termoestables adaptados a ambientes con frecuentes cambios de temperatura, como el caso de *Bacillus licheniformis* lb05, son capaces de generar enzimas con rangos de trabajo amplios, manteniendo niveles de actividad enzimática altos, aun fuera de los puntos óptimos reportados para ellas (4).

Objetivo: Determinar la actividad enzimática que presentan las amilasas producidas por *Bacillus licheniformis* lb05 a bajas temperaturas.

Metodología. Para la bacteria *Bacillus licheniformis* lb05, 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 (5). Posteriormente se determinó cualitativamente la producción de amilasas, tomando una muestra de 50 μ L del sobrenadante a las 24 hrs de cultivo. Este fue adicionado a placas de agar almidón, incubadas a 5 °C y después teñidas con 1.0 mL de solución lugol. Al comprobar la actividad enzimática de la bacteria, esta fue cuantificada a través de la técnica espectrofotométrica para detección de azúcares reductores a través del Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Resultados. Partiendo del crecimiento estandarizado de *B. licheniformis* lb05, la fase estacionaria inició a partir de las 72 horas de crecimiento (Fig. 1). Los análisis de la actividad enzimática se realizaron con cultivos no mayores a 48 horas. Con un nuevo cultivo de 24 horas se obtuvo su fracción enzimática, agregada a una serie de placas con agar almidón. Las placas se incubaron por 24 horas a diferentes temperaturas, obteniendo halos de degradación del almidón y confirmándose la actividad enzimática hidrolítica de la fracción enzimática conseguida por centrifugación (Fig. 2). El halo de degradación más grande se obtuvo a 5 °C. Por último, se realizó el análisis de producción de azúcares reductores a través del uso de DNS (Tabla 1). El mayor punto de actividad enzimática se obtuvo a las 72 horas, con 97.4 U mL⁻¹. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria hidrolizar 1 mg de glucosa por minuto a pH 7.0 y temperatura 15 °C.

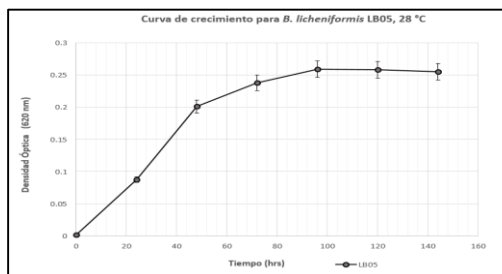


Fig. 1. Curva de crecimiento para *B. licheniformis* lb05 a 28°C/150 rpm, por 144 horas. Inicio de la fase estacionaria a partir de las 72 horas.

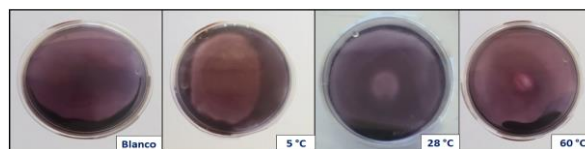


Fig. 2. Halos de degradación en placas de agar almidón. Tras la adición de 50 μ L de sobrenadante, se aprecian diferentes halos de degradación

Tabla 1. Niveles de actividad enzimática a diferentes tiempos. Condiciones de trabajo, 15 °C/150 rpm/120 hrs.

Tiempo (h)	U mL ⁻¹	Tiempo (h)	U mL ⁻¹
0	25.3	72	97.4
24	50.7	96	40.3
48	56.8	120	35.1

Conclusiones. La bacteria *B. licheniformis* lb05 tiene una actividad enzimática de 97.4 U mL⁻¹ a 15 °C. Además, presenta actividad hidrolítica a 5 °C.

Agradecimientos. Se agradece al CONACyT y UANL-FCQ por los fondos, equipos e instalaciones para realizar la presente investigación.

Bibliografía.

- Ries T *et al.*, (2014) α -Amylase Production and Applications: A Review J. Appl. Environ. Microbiol. 2(4):166–175.
- Lu M *et al.*, (2010) Cloning, expression, purification, and characterization of cold-adapted α -amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230 Protein J. 29(8)591–597.
- Sanchez A. C. *et al.*, (2019) Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3 Protein Expr. Purif. 155:78–85.
- 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.

