

## IDENTIFICACION, CARACTERIZACION ENZIMÁTICA Y BIOQUÍMICA DE LA $\alpha$ -GLUCOSIDASA DE *Aspergillus niger* ITV-01.

Del Moral Ventura Sandra T<sup>ab</sup>, Barradas Dermitz Dulce María<sup>c</sup>, Aguilar Uscanga María Guadalupe<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Cátedra-CONACyT, Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Ver., C.P. 91897, MÉXICO

<sup>b</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Ver., C.P. 91897, MÉXICO. [gaguilar@itver.edu.mx](mailto:gaguilar@itver.edu.mx).

<sup>c</sup>Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Ver., C.P. 91897, MÉXICO.

*Palabras clave:*  $\alpha$ -glucosidasa, *Aspergillus niger* ITV-01, harina de sorgo

**Introducción.** Las amilasas ( $\alpha$ -amilasas, glucoamilasas, pullulasas,  $\alpha$ -glucosidasas) hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -(1-4) del almidón, se usan en diferentes industrias como panificación, detergentes, textiles, jarabes fructosados y recientemente en la producción de etanol. A nivel industrial los principales microorganismos productores son del género *Bacillus* y *Aspergillus*. *Aspergillus niger* ITV-01 fue aislado de caña de azúcar en Orizaba, Ver.<sup>(1)</sup>, presenta entre otras actividades enzimáticas, actividad amilasa, sin embargo, dicha actividad no ha sido identificada ni caracterizada.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de operación óptimas de la enzima e identificar el tipo de actividad amilasa que presenta.

**Metodología.** Para incrementar la producción de la actividad amilasa se evaluaron distintas fuentes de nitrógeno en fermentación líquida: extracto de levadura (5 y 10 g/L) y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0, 10 y 25 g/L), así como el efecto de calcio ( $\text{CaCl}_2$ , 0.3 g/L). Las fermentaciones líquidas se llevaron a cabo a 34°C, 250 rpm, se cuantificó la acumulación de azúcares reductores y la actividad de la enzima por medio de halos de hidrólisis en cajas Petri con almidón (10 g/L). La enzima se recuperó por centrifugación y a partir del sobrenadante se purificó parcialmente mediante ultrafiltración (10 kDa), se identificó por espectrometría de masas (MS) y por los productos de hidrólisis generados en  $\alpha$ -pNPG (25 mM), almidón soluble (10 g/L) y maltosa (10 y 200 g/L) (HPLC y TLC). En almidón soluble se evaluaron: el efecto de pH (4-9), estabilidad a pH (4-9), efecto de temperatura (40-100°C), termoestabilidad (50, 55, 60 y 70°C) y efecto del calcio en la termoestabilidad. Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  en almidón soluble y la  $E_a$ .

**Resultados.** El extracto de levadura (10 g/L) en conjunto con el calcio incrementaron 2 veces la producción de la amilasa con respecto al medio con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (25 g/L), en cambio el medio con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (25 g/L) y extracto de levadura (5 g/L) favoreció la producción de biomasa, pero la actividad de la enzima fue incipiente. Se ha observado que concentraciones medias de nitrógeno y fuentes orgánicas favorecen la producción de amilasas, en cambio, el calcio promueve la exportación de la amilasa en *Aspergillus* al medio extracelular. La amilasa no tuvo actividad en almidón nativo, únicamente en almidón soluble. Los péptidos identificados por MS indicaron que la enzima es una  $\alpha$ -glucosidasa, estos resultados correlacionaron con la hidrólisis de sustratos específicos para  $\alpha$ -glucosidasas como el  $\alpha$ -pNPG, además, a partir de almidón soluble únicamente se produjo

glucosa y en presencia de altas concentraciones de maltosa (200 g/L) se observó actividad glucosiltransferasa, donde se produjeron maltooligosacáridos de DP3 y DP4 (DP, grado de polimerización). El rendimiento de la hidrólisis del almidón nativo (14 g/L) fue del 80%, donde se produjeron 11.2 g/L de glucosa. En cuanto a las características bioquímicas y enzimáticas, la  $\alpha$ -glucosidasa solo mostró una banda de actividad de 75 kDa en SDS-PAGE 10% y almidón soluble 1 g/L, su pH óptimo fue a 4.3, aunque a 7, mostró el 60% de actividad residual. La temperatura óptima se observó a 80°C, aunque la vida media a 50, 56 y 60°C fue 433, 99 y 63 min, respectivamente. La energía de activación fue similar a la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en acrilamida de *A. oryzae*,  $E_a=176.25$  kJ/mol<sup>(2)</sup>. Lo cual indica alta estabilidad a procesos industriales. El calcio no mostró efecto en la estabilidad de la enzima, lo que indica que la enzima es independiente de calcio. El efecto del sustrato sobre la actividad tuvo un comportamiento que se ajustó al modelo de Michaelis-Menten, donde sus parámetros cinéticos en almidón soluble,  $K_{cat}$  y eficiencia catalítica, fueron 1282 s<sup>-1</sup> y 224.91 (g/L)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 500 veces mayor que la  $\alpha$ -glucosidasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. También se evaluó el efecto de iones monovalentes y divalentes, agentes quelantes (EDTA), detergentes y alcoholes (etanol y metanol) en la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* ITV-01 y su actividad no se vio afectada en ninguno de los casos.

**Conclusiones.** Dadas las características de la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* ITV-01 a la estabilidad en solventes, estabilidad a pH ácido así como la producción de glucosa y su capacidad de transglucosilación, podría utilizarse para la producción de maltooligosacáridos de alto valor agregado en sistemas acuosos u orgánicos, utilizarse para la producción de glucosa a partir de tubérculos (papa, camote) o granos (maíz, harina de sorgo), o bien puede ser clonada para la producción de etanol.

**Agradecimiento.** A CONACyT-SAGARPA por el financiamiento 291143 y al PN-2017-4650

### Bibliografía.

1. Ortega-Platas A. (2008). Aislamiento y caracterización de la cepa *A. niger* ITV01 de caña de azúcar para la producción de xilitol. Tesis de Licenciatura. ITV. Veracruz, México.
2. Raviyan, P. A. R., Ang, J. U. T., & Asco, B. A. A. R. (2003). Thermal Stability of  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus oryzae*



**Introducción.** Utilizar este formato para redactar el resumen del trabajo libre en una sola hoja tamaño carta, respetando el encabezado con los símbolos de la SMBB y del Congreso, de manera que al final quede en el formato estándar (márgenes y espaciado), antes de convertirlo a PDF y se envíe a evaluación en el Área correspondiente. Se deberá optimizar el uso del espacio para escribir lo más importante del trabajo, no usar sangría. Revisar bien la redacción y de preferencia utilizar el punto y seguido. No dejar espacios entre párrafos. Al final de la introducción, en un párrafo aparte, deberá definirse el objetivo del trabajo.

**Metodología.** Se recomienda no describir paso a paso las técnicas, de preferencia se explicará la estrategia del trabajo y se citarán las referencias de los métodos, privilegiando el espacio. En algunos casos se recomienda describir o referenciar el principio de la técnica usada. Los nombres científicos se escriben en *letra cursiva*. Para los compuestos químicos se utilizarán fórmulas condensadas y su concentración será expresada en g/L, mM, ppm ó %, según convenga.

**Resultados.** En esta sección, se pueden incluir figuras o tablas, así como el texto descriptivo. No se aceptarán trabajos que omitan alguna de las secciones aquí citadas, ni aquellos que estén escritos en menos de 80% del espacio de una página, para lo cual se puede ajustar el tamaño de las figuras o tablas (**Fig. X** o **Tabla X** escrito en **negrita** en el cuerpo del texto).



**Fig. 1.** (← **negritas**) Las Figuras llevan un título y una descripción corta al pie, centrada con letra Arial tamaño 8, escritos **sin negritas**.

**Tabla 1.** Se pueden insertar Tablas. El título va con letra Arial tamaño 8, centrado y arriba de la Tabla. Evitar el sombreado por renglón.


**Conclusiones.** Se debe ser preciso y no repetitivo al escribir las conclusiones a partir de los resultados.

**Agradecimientos.** Se puede escribir aquí la fuente de financiamiento de la investigación.

**Bibliografía.** Las citas se escribirán en letra Arial tamaño 8. Para un trabajo de esta extensión, el número adecuado de citas bibliográficas es de cinco. En el texto, las referencias deberán ir numeradas, entre paréntesis (1) y en orden de aparición (2). Los ejemplos a continuación son para **artículo**, **capítulo de libro** y **memorias de congreso**, respectivamente. Por cuestión de

espacio, se puede omitir el título de los artículos en este resumen.

1. Apellido e Inicial del nombre de cada coautor, separados por comas. (Año). *Abreviatura de la revista en letra cursiva*. vol (num): pág-pág. Si hay más de tres autores, solo se escribir el nombre del primer autor seguido de et al. en *italico*. Las abreviaturas de las revistas deberán ser tomadas de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.

**Ejemplo:** García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56:6454-6459. Bourbon A *et al.* (2011) *J. Food Eng.* 106:111-118.

2. Apellido e Inicial del nombre de cada coautor, separados por comas. (Año). Título del capítulo. En: *título del libro en letra cursiva*. Apellido del Editor(es) e Inicial de nombre(s) seguido de (ed) o (eds). Editorial, País de edición. pág-pág. Utilizar *et al.* si hay más de tres autores o editores.

**Ejemplo:** Uchihashi T, Kodera N & Ando T (2015) High-Speed Atomic Force Microscopy. En: *Noncontact Atomic Force Microscopy, Vol. 3*. Morita S *et al.* (eds), Springer, Switzerland. pp 481-514.

3. Apellido e Inicial del nombre de cada coautor, separados por comas. Título del trabajo. *Nombre del congreso en letra cursiva*, Lugar de realización, fecha, clave del trabajo. Utilizar *et al.* si hay más de tres autores.

**Ejemplo:** Reyes N *et al.* Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Morelia Mich., México, 25-29 de junio del 2007, OIII-12.

#### Notas:

1. Las palabras: **Introducción, Metodología, Resultados, Conclusiones, Bibliografía y Agradecimientos** van escritas con letra **Arial negrita 10**. El resto del texto de cada sección deberá ir escrito con letra normal Arial tamaño 10, a menos que se indique otro formato.
2. El nombre del trabajo, la lista de autores y el autor responsable, deberán llenarse en línea en: <https://smbb.mx/xviii-congreso-nacional-de-biotecnologia-y-bioingenieria-leon-2019/#info>. En cuanto se abra la recepción de trabajos.
3. Una vez que se tenga el resumen revisado y autorizado por todos los autores, se deberá convertir a PDF que es el único formato aceptado el sistema de evaluación.
4. El archivo deberá tener como máximo 2 MB, si las imágenes insertadas son muy pesadas deberán ser comprimidas en formato JPEG.
5. **El resumen, si es aceptado, será reproducido sin modificaciones, tal como fue enviado, por lo que su contenido es responsabilidad de los autores.**