



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Purificación de la amilasa de una bacteria del
género *Streptococcus* aislada del pozol,**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

VIRGILIO VIRGILIO TAMARA ARIZBE



MÉXICO, D. F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2005

m. 347268



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

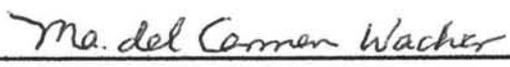
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Aguilar Caballero Raúl
Vocal	Prof. Velázquez Madrazo Olga
Secretario	Prof. Díaz Ruíz Gloria
1er. Suplente	Prof. Palao Rincón Mercedes
2° Suplente	Prof. Quirasco Baruch Maricarmen

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 324, Edificio E, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria.


Asesor: Glória Díaz Ruíz


Asesor Técnico: M. Carmen Wachter R.


Sustentante: Virgilio Virgilio Tamara

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora **Romina Rodríguez Sanoja** por su colaboración en el proyecto.

A **PAPIIT IX226604** por el apoyo económico del proyecto.

Al **Subprograma 127 "Iniciación básica en investigación"**, por el apoyo económico.

A la Doctora **Gloria Díaz** y a la Doctora **Carmen Wachter** por su amistad y apoyo incondicional brindado.

A mis padres: **María Virgilio** y **Amado Virgilio** por su ejemplo, su coraje, su convicción, por esforzarse en ser los mejores padres, por estar conmigo en cada momento decisivo de mi vida, por hacerme parte de su espacio y de su tiempo.

A **Trilce** y **Tania** por estar a mi lado en cada momento y hacerme presente que en cualquier día puedo contar con ellas.

A **Graciela, Piedad, Luis** y **Cecilio** por el cariño que siempre me han mostrado, por la dicha de tenerlos junto a mí.

A **Perla, Yessica, Nancy, Cristina, Adrián** y **Dan** por estar presentes en momentos tan especiales, por su amistad.

A mis amigos: **Rosalba, Carlos, Miguel, Nessim, Hugo, Alex, Mariana, Sandra B.N., Dafne, Rocío, Panda** y **Gaby** por contagiarme su alegría y por los buenos momentos que hicimos juntos.

A mi familia: **Verónica, Ana, Ingrid, Erick, César, Diego, Bruno, Mixtzin Zaira, Eli, Luis, Sergio, Orlando, Lorena, Edgar, Alber, Mayra, Miguel, Lulú, Agus, Aureo, Pato, Toñita, Mario, Mariana, Luis, Yoni** y **Norma**, por haberme acompañado a lo largo de este tiempo.

A **Daniel** por mostrarme con hechos que no existen imposibles, por llevarme a los extremos de mis emociones.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
I. Resumen	1-2
II. Introducción	3-4
III. Antecedentes	5-29
Pozol	5
Elaboración	5-6
Microbiología del pozol	6-8
<i>Streptococcus</i>	8-10
Maíz	10-11
Nixtamalización	11
Almidón	11-13
Amilasas	13-16
<i>Producción industrial de glucosa y fructosa a partir de almidón</i>	13-14
Panadería	14-15
<i>Formación de ciclodextrinas/ formación de cicloamilosa</i>	15-16
Otros usos	16
Clasificación	17-18
α -amilasa	18-19
Determinación de la actividad α -amilolítica	19-21
a) <i>Determinación de la actividad dextrinizante</i>	19-20
b) <i>Método de Sandstedt Kneen and Blish (SKB)</i>	20
c) <i>Método de la farmacopea india</i>	20
d) <i>Incremento en los azúcares reductores ó método del ácido dinitrosalicílico (DNS).</i>	20-21
e) <i>Decremento en la viscosidad de la suspensión de almidón</i>	21

Contenido	Página
Purificación de las α -amilasas	21-22
Técnicas cromatográficas para purificación de proteínas	22-24
<i>Cromatografía de Intercambio Iónico</i>	23
<i>Cromatografía de Exclusión Molecular</i>	23
<i>Cromatografía de Afinidad</i>	23-24
Propiedades bioquímicas de las α -amilasas	24-26
<i>Especificidad al sustrato</i>	24
<i>pH óptimo y estabilidad</i>	24-25
<i>Temperatura óptima y estabilidad</i>	25
<i>Peso molecular</i>	25
<i>Inhibidores</i>	25
<i>Calcio y estabilidad de α-amilasas</i>	25-26
Amilasas de Bacterias Lácticas	26-29
IV. Hipótesis	30
V. Objetivos	30
Objetivo General	30
Objetivos Particulares	30
VI. Metodología	31-41
Descripción de la cepa	31
Etapas 1. Separación y purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 a partir de células congeladas	31-36
1. <i>Células congeladas</i>	31
2. <i>Prueba de actividad amilolítica en células congeladas</i>	31-32
3. <i>Pruebas de liberación de la amilasa</i>	32-34
a) <i>Tratamiento con Tritón X-100</i>	32
b) <i>Tratamiento con sonda de ultrasonido</i>	32-33
c) <i>Tratamiento con urea</i>	33
d) <i>Tratamiento con Tris-Sacarosa</i>	33-34

Contenido	Página
4. Mejoramiento del rendimiento de la extracción de la amilasa por medio de urea 8 M	34
5. Determinación de proteína	34
6. Prueba de purificación de la amilasa en extracto celular obtenida a partir de la liberación de la enzima de células congeladas con urea	35
7. Evaluación de la prueba de purificación de la amilasa obtenida a partir de células congeladas	35-36
Etapa 2. Separación y purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 a partir de células recién cultivadas	36-41
1. Activación de la cepa	36
2. Obtención de extractos celulares cultivados	36
3. Pruebas de liberación de la amilasa	37
4. Preparación de la muestra para la purificación	37
5. Preparación de la columna para la purificación	37-38
6. Purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> a partir de células recién cultivadas	38
7. Estimación del peso molecular y evaluación de la purificación	38-39
8. Determinación de proteína	39
9. Métodos de concentración de la amilasa	39-41
a) Concentración de la amilasa por filtración (Microcon YM-10)	39-40
b) Concentración de la amilasa (Speed Vac SDP1010 Speed Vac ^T System of Thermo Savant)	40-41
c) Concentración de la amilasa (liofilización LABCONCO 40918822)	41

Contenido	Página
VII. Resultados y discusión	42-67
Etapa 1. Separación y purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 a partir de células congeladas	42-53
Actividad amilolítica en las células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124	42
Pruebas de liberación de la amilasa	43-46
Mejoramiento del rendimiento de la extracción de la amilasa por medio de urea 8 M	46-47
Prueba de purificación de la amilasa en extracto celular obtenida a partir de la liberación de la enzima de células congeladas con urea	47-49
Evaluación durante 1.5 meses de la actividad amilolítica de la amilasa liberada por medio de urea 8 M y por sonicación.	49-50
Evaluación del método de sonicación para la liberación de la amilasa de células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124.	50-53
Etapa 2. Separación y purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 a partir de células recién cultivadas	53-67
Evaluación de la actividad de la amilasa de células recién cultivadas en almacenamiento a 4 °C.	57-60
Purificación de la amilasa de extractos celulares obtenidos con sonicación.	60-64
a) Características de la muestra	60
b) Separación de la proteína de interés	60
Métodos de concentración de la amilasa	64-67
VIII. Conclusiones	68-69

Contenido	Página
IX. Perspectivas	70
X. Bibliografía	71-76
AI. Anexo I. Preparación de medios de cultivo y disoluciones	77-83
AII. Anexo II. Tratamiento de la membrana de diálisis	84
AIII. Anexo III. Composición y Preparación de Geles de acrilamida/bis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	85-87
AIV. Anexo IV. Curva Patrón de la prueba de actividad amilolítica	88-89

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Actividad amilolítica asociada las células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124. Dilución 1/10 y 2/10.	42
Tabla 2. Evaluación de la eficiencia de los tres métodos utilizados en la liberación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124.	43
Tabla 3. Efecto de la cantidad de suspensión celular en la actividad amilolítica liberada con el tratamiento de urea.	46
Tabla 4. Actividad amilolítica de la enzima liberada con el tratamiento de urea y sonicación en células congeladas.	49
Tabla 5. Evaluación del método de sonicación para la liberación de la amilasa de células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124.	50
Tabla 6. Actividad amilolítica de la enzima liberada de células cultivadas el mismo día y tratados con urea, tritón x-100 y sonicación.	54
Tabla 7. Actividad Amilolítica del proceso de liberación por sonicación de la enzima liberada en extracto celular recién cosechado.	54
Tabla 8. Actividad amilolítica y concentración de proteína presente después del proceso de purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124.	62
Tabla 9. Eficiencia del método de concentración de la amilasa purificada de <i>S. infantarius</i> 25124.	64
Tabla 10. Curva patrón de almidón para determinar la actividad amilolítica de <i>S. infantarius</i> 25124 por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo.	88

Contenido	Página
Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de la amilasa de <i>S.infantarius</i> 25124 liberada por medio de sonicación después del almacenamiento a 6°C.	58
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, del sobrenadante de la liberación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 por medio de sonicación después de almacenar a 6°C (zimograma).	59
Figura 12. Espectro de purificación obtenido de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 por medio del equipo de FPLC ÄKTAprime 01117322, en una columna con gel de sefarosa 6-β-epoxiactivada (Pharmacia) acoplado a β-ciclodextrina (Sigma).	61
Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación.	62
Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones obtenidas en la purificación de la enzima de <i>S. infantarius</i> 25124 (zimograma).	63
Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones de purificación obtenidas durante este proceso.	65
Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones de purificación obtenidas en la purificación de la enzima de <i>S. infantarius</i> 25124.	66
Figura 17. Curva patrón de almidón utilizada para evaluar la actividad amilolítica de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124 por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo utilizando almidón (PROLABO 7g/L).	89

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Actividad amilolítica asociada a las células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124. Dilución 1/10 y 2/10.	42
Tabla 2. Evaluación de los tres métodos utilizados en la liberación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124.	43
Tabla 3. Efecto de la cantidad de suspensión celular en la actividad amilolítica liberada con el tratamiento de urea 8 M.	46
Tabla 4. Actividad amilolítica de la enzima liberada con el tratamiento de urea y sonicación en células congeladas.	49
Tabla 5. Evaluación del método de sonicación para la liberación de la amilasa de células congeladas de <i>S. infantarius</i> 25124.	50
Tabla 6. Actividad amilolítica de la enzima liberada de células cultivadas el mismo día y tratados con urea, Tritón X-100 y sonicación.	54
Tabla 7. Actividad Amilolítica del proceso de liberación por sonicación de la enzima liberada en extracto celular recién cosechado.	54
Tabla 8. Actividad amilolítica y concentración de proteína presente después del proceso de purificación de la amilasa de <i>S. infantarius</i> 25124.	62
Tabla 9. Eficiencia del método de concentración de la amilasa purificada de <i>S. infantarius</i> 25124.	64
Tabla 10. Curva patrón de almidón utilizada para determinar la actividad amilolítica de <i>S. infantarius</i> 25124 por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo.	88

I. RESUMEN

El pozol es una bebida refrescante, ácida, no alcohólica, obtenida de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado (Ulloa y col. 1987). El polisacárido más abundante en el maíz es el almidón (75 %-85 % de peso en base seca), aunque también están presentes mono y disacáridos en baja concentración (Boyer y Shannon, 1987). Durante la nixtamalización la concentración de mono y disacáridos disminuye considerablemente (Trejo-González y col. 1982), por lo que el almidón debe ser un sustrato esencial para la fermentación (Díaz-Ruiz y col. 2003). La fermentación del pozol es llevada a cabo por una microbiota natural como resultado de la contaminación del nixtamal y está constituida por bacterias, levaduras y hongos (Wacher y col. 1993). En estudios con microbiología tradicional (Wacher y col. 1993) y molecular (Ampe y col. 1999) se encontró que la microbiota predominante durante todas las etapas de fermentación del pozol son las bacterias lácticas. El género *Streptococcus* es el predominante entre las bacterias lácticas amilolíticas del pozol (Díaz-Ruiz y col. 2003). En un estudio previo (Díaz, 2003), se encontró que la amilasa de *Streptococcus infantarius* 25124 está asociada a la célula y la amilasa presente en los extractos celulares es de alto peso molecular (200-250 kDa). El objetivo del trabajo fue purificar la amilasa producida por una cepa del género dominante en la fermentación del pozol, *Streptococcus infantarius* 25124. Se utilizaron células congeladas para extraer la amilasa y se observó que la enzima ya presentaba daño, por lo cual se cultivaron las células en condiciones óptimas de crecimiento reportadas por Díaz (2003) y la liberación de la amilasa se hizo por medio de sonicación. La enzima liberada se unió a β -ciclodextrina acoplada a sefarosa para su purificación por medio de FPLC

(Cromatografía Líquida de Alta Resolución). El gel de proteínas indicó que la enzima estaba pura y se corroboró el alto peso molecular de la amilasa (mayor a 250 kDa). La purificación se logró con baja eficiencia, por lo que se concentró la enzima por tres diferentes métodos, de los cuales el mejor método fue la evaporación de agua a altas velocidades.

II. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida, refrescante, no alcohólica, que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de nixtamal y se consume desde tiempos prehispánicos en el sureste de México (Ulloa y col. 1987).

El primer paso para la elaboración del pozol, es la nixtamalización del maíz (cocción alcalina, remojo y lavado del maíz), después se muele el grano limpio y se forma una masa, se moldea en forma de bolas y se envuelven en hojas de plátano; dichas bolas envueltas se fermentan a temperatura ambiente por 4-5 días. Para preparar la bebida, la masa fermentada se suspende en agua potable y queda lista para tomarse (Ulloa y col. 1987).

El polisacárido más abundante en el maíz es el almidón (75 %-85 %) dependiendo del tipo de maíz, aunque también están presentes mono y disacáridos en baja concentración (Boyer y Shannon, 1987). Durante la nixtamalización la concentración de mono y disacáridos disminuye considerablemente (Trejo-González y col. 1982), por lo que el almidón debe ser un sustrato esencial para la fermentación láctica (Díaz, 2003).

La fermentación del pozol es llevada a cabo por microbiota natural constituida por bacterias lácticas, hongos y levaduras (Wacher y col. 1993). Las bacterias lácticas son el grupo mayoritario presente en la fermentación del pozol, y se han identificado cinco géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weissella* (Nuraida y col. 1995; Wacher y col. 2000; Ampe y col. 1999; Escalante y col. 2001).

Se determinó la presencia de bacterias del género *Streptococcus* en el pozol (Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante y col. 2001) y en un estudio sobre la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol se determinó que las cepas del género *Streptococcus* son las predominantes (Díaz-Ruíz y col. 2003).

La capacidad de las bacterias lácticas para fermentar el almidón fue reportada por primera vez por Sherman en 1937. La mayor parte de las amilasas producidas por estas bacterias son extracelulares, existen especies que producen amilasas asociadas a la célula y en algunos casos que son intracelulares (Díaz, 2003). La amilasa de *Streptococcus infantarius* 25124 está asociada a la célula y en estudios con el extracto se ha determinado un alto peso molecular (200-250) kDa.

III. ANTECEDENTES

POZOL

El pozol, del náhuatl *pozolli* que significa espumoso, es una bebida mexicana refrescante, no alcohólica hecha a base de masa de maíz nixtamalizado que se moldea en forma de bolas, éstas se fermentan y se suspenden en agua para su consumo (Ulloa, 1983; Cañas, 1993). Esta bebida es consumida por pueblos indígenas y mestizos durante las comidas o como refresco a cualquier hora del día (Romo, 1998). Al pozol se le puede ó no añadir otro sabor, agregando ingredientes como: sal, azúcar, miel, canela, cacao ó chile (Ulloa, 1983; Cañas, 1993). El pozol es preparado ya sea en forma doméstica, para el consumo familiar, o en escala semi-comercial. La zona de producción y consumo del pozol está localizada en el sureste del país básicamente en los siguientes estados: Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Yucatán y en menor proporción Veracruz (Ulloa y col. 1987).

ELABORACIÓN

Cañas (1993) indica que existen dos métodos de preparación del pozol: el tradicional y el mestizo. En el método tradicional, el grano de maíz es hervido en agua con cal hasta que el grano se hinche y la cáscara se separe fácilmente. Los granos se pelan, se lavan con agua, y se muelen formando una masa martajada. La masa se moldea en forma de bolas de 5 a 8 cm de diámetro y que llegan a pesar hasta 1 kg, éstas se cubren con hojas de plátano y se almacenan a temperatura ambiente de 1 a 5 días antes de consumirse. (Ulloa, 1974; Ulloa y col. 1983; Cañas, 1993; Wachter, 1993). El pozol tipo mestizo lleva el mismo procesamiento, sólo que se agrega un paso de cocción al grano

antes de molerlo para reducir la cantidad de sedimento sólido presente en la bebida cuando la masa se suspende en agua (Wacher y col. 2000).

MICROBIOLOGÍA DEL POZOL

El pozol es el producto de fermentación efectuado por una microbiota natural que es consecuencia de la contaminación del nixtamal durante la molienda y está constituida por hongos, levaduras y bacterias (Wacher y col. 1993).

Las bacterias lácticas son el grupo mayoritario presente en la fermentación del pozol y se han identificado cinco géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weisella* (Nuraida y col. 1995; Wacher y col. 2000; Ampe y col. 1999; Escalante y col. 2001). En estudios con microbiología tradicional (Wacher y col. 1993; Nuraida y col. 1995) y con biología molecular (Ampe y col. 1999; Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante y col. 2001) se encontró que la microbiota predominante durante todas las etapas de fermentación del pozol son las bacterias lácticas. Las bacterias lácticas predominantes aisladas fueron *Leuconostoc spp.*, lactobacilos homofermentativos, lactococos y lactobacilos heterofermentativos productores de dextrana y además se identificaron *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuraida y col. 1995).

Escalante (2001) estudió la microbiología del pozol utilizando la secuencia de una biblioteca de clonas de una región del gen ribosomal 16S, el análisis indicó que sólo 14 secuencias fueron únicas clonas y éstas fueron identificadas como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarium* y *Lactobacillus delbruekii*. A través de estudios hechos por la técnica DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) se determinó la huella de

la comunidad microbiana de una muestra de pozol de 5 días de fermentación. La banda correspondiente a *Streptococcus* fue la más intensa y estaba presente en todos los tiempos de la fermentación (Ampe y col. 1999). Un estudio posterior indicó que *Streptococcus* es el grupo más activo de la microbiota presente en el pozol (Ben Omar y Ampe, 2000). Se detectó la presencia de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Weisella paramesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbruekii* (Ampe y col. 1999; Ben Omar y Ampe, 2000).

Bolaños (2003) estudió la variabilidad de bacterias lácticas entre pozoles de 7 diferentes productores de Tabasco, por medio de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Se detectaron microorganismos que estuvieron presentes en casi todas las muestras (*Weisella*, *Pediococcus urinae-equi*, *Streptococcus suis* y *Aerococcus sp.*). El género *Lactobacillus* estuvo presente en casi todas las muestras recién molidas pero desaparecía a lo largo de la fermentación. Se encontró que *Lactococcus* y *Leuconostoc* estaban presentes esporádicamente en la fermentación.

Las bacterias lácticas son los microorganismos predominantes en la fermentación pero se han encontrado otras especies como: *Bacillus minimum*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bifidobacterium minimum*, *Sphingomonas sp*, y enterobacterias (Ben Omar y Ampe, 2000). *Bacillus subtilis* (Ampe y col. 1999), *Clostridium sp.* (Escalante y col. 2001) *Acetobacter sp.* (Ampe y col. 1999) y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz y col. 2003). Se encontraron diferentes serotipos de *E. coli* (Sainz y col. 2001).

Ulloa y col. (1974) examinaron los hongos y levaduras que se encuentran en las fermentaciones tradicionales de pozol, las más dominantes fueron las levaduras del

género *Candida* y levaduras filamentosas como *Trichosporon cutaneum*, y los hongos: *Geotrichum candidum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sp.*

Streptococcus

Se determinó la presencia de bacterias del género *Streptococcus* en el pozol (BenOmar y Ampe, 2000; Escalante, 2001) y en un estudio sobre la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol se determinó que las cepas del género *Streptococcus* son las predominantes (Ampe y col. 1999), aunque se identificaron otros géneros como *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Ben Omar y Ampe, 2000).

Las bacterias del género *Streptococcus* son Gram positivas, con forma esférica y células ovoides entre 0.8-1.0 μm de diámetro, que están típicamente asociadas en cadenas ó pares. Estos cocos son anaerobios facultativos, no esporulados, catalasa negativa, homofermentativos y tienen requerimientos nutricionales complejos. Estas cepas tienen la capacidad de crecer en medio con contenido de sal del 6.5% y a pH 9.6. Actualmente existen aproximadamente 40 especies dentro del género *Streptococcus*. Mediante el análisis comparativo de las secuencias del gen ADNr 16S se demostró que la mayoría forman parte de seis grupos de especies (Poyart y col. 2002).

La interpretación de las secuencias del gen ADNr 16S puede ser muy complicada por la diferencia de secuencias que pueden existir entre cepas aisladas, y por el hecho de que las especies relacionadas pueden tener secuencias prácticamente idénticas del gen ADNr 16S. Para diferenciar tales cepas, es posible utilizar secuencias alternativas con una diferencia mayor a la del gen ADNr 16S. El gen *sod A* de los cocos Gram positivos,

el cual codifica a la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn), cumple estos criterios (Poyart y col. 2002).

En un estudio previo se realizó la secuencia parcial del gen ADNr 16S de algunas cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol, incluyendo la utilizada en este trabajo. Los resultados de dichas secuencias parciales no permitieron la identificación de las cepas, por lo que se secuenció completamente el gen ADNr 16S de *S. bovis* 25124, sin embargo, por la estrecha relación filogenética presente en este grupo no fue posible identificar la cepa. Los resultados encontrados en el BLAST muestran porcentajes de identidad de entre 100-99 % de la secuencia completa de la cepa 25124 con más de 30 secuencias de otros estreptococos en la base de datos. Por medio del gen *sod A* de los cocos Gram positivos, se logró identificar la bacteria antes llamada *S. bovis* 25124 como *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius*, con un 100 % de similitud (Comunicación personal, Bolaños 2005).

Streptococcus infantarius (in.fan.ta'ri.us Adjetivo infantarius relativo a los niños). Las células son cocos Gram positivos asociados en pares ó cadenas cortas, y son no móviles, no esporuladas y catalasa-negativa. Las colonias sobre agar sangre son circulares con 1 mm de diámetro (después de 24 h de incubación a 37 °C), no tienen color y son α -hemolíticos.

Las cepas muestran crecimiento homogéneo en disolución amortiguadora de dextrosa y en caldo infusión cerebro corazón. El crecimiento es mayor en una atmósfera con 5 % de CO₂. El crecimiento también ocurre en medio de crecimiento MRS, sin producción de gas.

Muchas de las cepas de *S. infantarius* subespecie *infantarius* no hidrolizan escualeno y son β -glucosidasa y metil β -D-glucopiranosido negativo. Producen ácido a partir de glicógeno, melobiosa, pululano y almidón, con algunas excepciones. Las cepas han sido aisladas de heces infantiles, otras han sido obtenidas de casos clínicos (sangre y orina), ó en productos alimenticios como chícharos y productos derivados de la leche (Schlegel y col. 2000).

MAÍZ

El maíz (*Zea mays*) es un cereal originario de Mesoamérica. Hay varios tipos de maíz según su clasificación con base en sus propiedades físicas y funcionales, éstos son: amarillo, blanco, azul y morado, dentado, cristalino, palomero, ceroso, alto en lisina, alto en amilosa, alto en aceite y pozolero ó cuzco (Serna, 1996). La calidad de la cocción alcalina requiere de granos de maíz uniformes, sanos, con una dureza intermedia con pericarpios fáciles de retirar y granos firmes, libres de grietas ó astillas, con un color blanco ó medio amarillo sin tinciones de rojo u otros colores. Debido a su color y dureza las mazorcas blancas son las preferidas (Rooney, 1995). La proporción de las partes anatómicas del maíz son: pericarpio 6 %, aleurona 2.8 %, endospermo 78-80 % y germen 12 %. El pericarpio del maíz está compuesto por hemicelulosa 70 %, celulosa 23 % y lignina 0.1 %, y es donde se encuentran la fibra y las cenizas. El endospermo está constituido principalmente de almidón (72-73 % en peso seco) y el 70 % de la proteína total del grano se encuentra presente en el endospermo. Al germen lo componen lípidos, algunas proteínas y vitaminas. El grano contiene mono y disacáridos como: sacarosa (disacárido más abundante), fructosa y glucosa, representan el 1-3 %

del grano entero. El maíz de diente blanco contiene aproximadamente entre 8-10% de proteína, 3.5-4.5 % de grasa, 1.5-2.0 % de ceniza, 1.5-2.1 % de fibra cruda, 1.4-2.0 % de azúcares solubles, 10-14 % de agua y 65-70 % de almidón (Boyer y Shanon, 1987; Rooney, 1995).

NIXTAMALIZACIÓN

El proceso realizado al maíz para la preparación del pozol, involucra un primer paso que es la llamada nixtamalización (de *nextli* que significa ceniza y *tamalli* que significa masa de maíz), que consiste en cocer los granos de maíz en una suspensión de agua con cal al 1 % (p/v) por 1.5 horas (Wacher y col. 2000); el grano se lava, y el agua de lavado (nexayote) se elimina, el grano cocido (nixtamal) se martaja.

Después del proceso de nixtamalización, la concentración de mono y disacáridos presentes en el maíz se reduce considerablemente, Santillana (1995) reportó una reducción en la concentración de sacarosa de 0.1 a 0.7 g por 100 g en base seca. En el nexayote se han reportado valores de 14.5 g/L de carbohidratos totales (Trejo-González y col. 1982).

ALMIDÓN

El almidón es la reserva de energía predominante en las plantas, éstas sintetizan el almidón como resultado de la fotosíntesis, proceso durante el cual la energía solar es convertida en energía química (Van der Maarel y col. 2001). De todos los polisacáridos el almidón es el único producido en pequeños agregados individuales, denominados gránulos (Fennema, 1993).

El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina, estos dos polímeros tienen diferentes estructuras y difieren sustancialmente en muchas propiedades físicas. La amilosa es un polisacárido lineal que está formado por unidades de α -D-glucosa con uniones α -1,4 y escasas ramificaciones en α -1,6, (Fogarty y Kelly, 1979). El contenido de amilosa en el almidón varía dependiendo del origen de éste y va desde 0 a 75 %, pero el porcentaje típico de amilosa en el almidón es de 20-25 %, la cantidad de unidades α -D-glucosa en amilosa va desde 1000 a 6000

El almidón de maíz está compuesto por: 20–25 % de amilosa y 75–80 % de amilopectina. La amilopectina es un polisacárido ramificado con unidades de α -D-glucosa unidas por enlaces α -1,4 (de 10-60 unidades D-glucosa) y hay ramificaciones en α -1,6 (de 15-45 unidades D-glucosa). La molécula completa de amilopectina contiene cerca de 2,000,000 de unidades de D-glucosa (Van der Maarel y col. 2001).

Los gránulos de almidón están formados por moléculas de amilosa y/o amilopectina ordenadas de forma radial. Contienen regiones cristalinas y amorfas (Figura 1), (Fennema, 1993).

En los almidones provenientes de tubérculos y raíces, las regiones cristalinas están solamente compuestas por amilopectina, mientras que la amilosa está presente en las regiones amorfas. En los almidones provenientes de cereales, la amilopectina también es un importante componente de las regiones cristalinas. La amilosa en los almidones de cereales está unida a lípidos que forman una estructura cristalina débil y que ayudan a reforzar el gránulo (Van der Maarel y col. 2001).

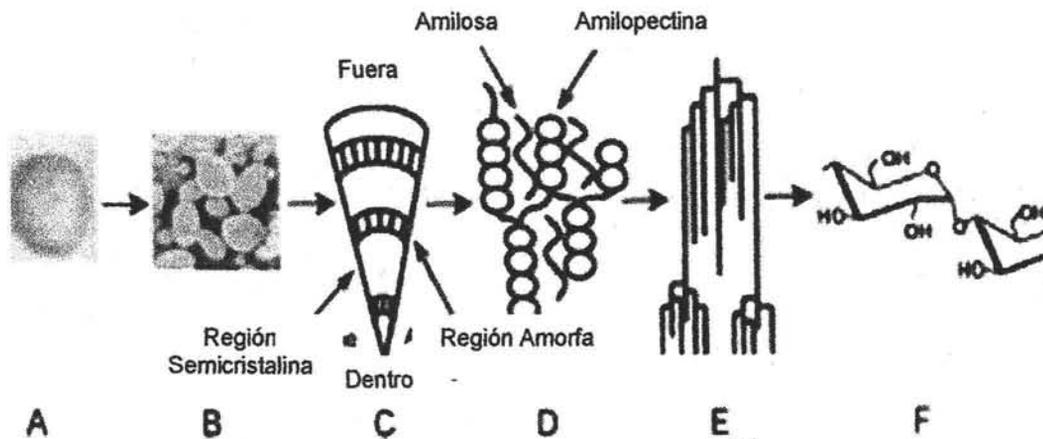


Figura 1. Zoom de la composición del almidón de papa. A. Tubérculo; B. Imagen en microscopía electrónica de los gránulos de almidón; C. Porción de un gránulo de almidón mostrando los anillos crecientes de las regiones semi-cristalinas y amorfas; D. Detalles de la región semi-cristalina. E. Organización de las moléculas de amilopectina en estructura de árbol. F. Dos moléculas de glucosa con enlaces glicosídicos $\alpha,1-4$ (Van der Maarel y col. 2001).

AMILASAS

Las enzimas que degradan el almidón están distribuidas ampliamente en la naturaleza, en animales, plantas y microorganismos. Actualmente estas enzimas tienen gran importancia en la biotecnología con aplicaciones en la industria de los alimentos, fermentaciones, textiles, detergentes y papel.

Producción industrial de glucosa y fructosa a partir de almidón. El dulzor del jarabe de almidón depende del grado de hidrólisis. La hidrólisis completa sólo genera glucosa. Para la conversión completa a jarabe de alta glucosa el primer paso es la licuefacción del almidón transformándolo en cadenas cortas de dextrina soluble. Un 30-35 % de los sólidos secos de almidón se mezcla con α -amilasa a pH 6 y pasa a través de un equipo donde la temperatura se eleva hasta 95-105 °C por 90 minutos. La temperatura arriba de los 100 °C es utilizada para asegurar que se remuevan los complejos lípido-almidón.

Inicialmente se utilizaba la α -amilasa de *Bacillus amyloquefaciens*, y después fue reemplazada por la amilasa de *Bacillus stearothermophilus* ó *Bacillus licheniformis*. El siguiente paso es la sacarificación ó transformación de este jarabe de almidón hidrolizado a un jarabe con alta concentración de glucosa, con más del 95 % de glucosa. Esto se hace por medio de una glucoamilasa que hidroliza enlaces glicosídicos α ,1-4 del extremo no reductor de la cadena. Comúnmente se utiliza la glucoamilasa de *Aspergillus niger* ó de una especie cercana. Esta amilasa tiene un pH óptimo de 4.2 y es estable a 60 °C. Para tener un buen proceso de sacarificación, el pH del jarabe de almidón hidrolizado es ajustado a 4.5 utilizando ácido clorhídrico y el producto se denomina jarabe refinado. El tercer paso es la conversión de jarabe alta glucosa en jarabe de alta fructosa (la fructosa es 2 veces más dulce que la glucosa). Esta conversión se hace utilizando la D-xylosa-cetol isomerasa conocida como glucosa isomerasa. El jarabe de alta fructosa es refinado con filtros de carbono, es concentrado a 40 % de sólidos y es ajustado a pH 7-8. El jarabe refinado se pasa por una columna que contiene la glucosa isomerasa. Los niveles máximos de fructosa alcanzados son cercanos al 55 % (Van der Maarel y col. 2001).

Panadería. La industria de panificación es una gran consumidora de almidón y de enzimas que modifican el almidón. La harina está constituida principalmente por gluten, almidón, polisacáridos y lípidos. Inmediatamente después de la preparación de la masa, las levaduras comienzan la fermentación de azúcares disponibles, en alcohol y dióxido de carbono, que causa aumento de volumen de la masa. Las amilasas pueden ser agregadas a la masa para degradar el almidón dañado en la harina y convertirlo en pequeñas dextrinas, que subsecuentemente son degradadas por las levaduras, por lo

que aumenta el volumen de la masa de manera considerable y mejora la textura del pan, se utilizan α -amilasas provenientes de hongos. Muchas enzimas se han utilizado para mejorar el pan ó la masa, por ejemplo la glucosa oxidasa, hemicelulasa, lipasa, proteasa y xilanasa. Las enzimas que degradan el almidón se han utilizado como agentes que retardan el endurecimiento del pan, por ejemplo: α -amilasas, enzimas ramificantes y desramificantes, amilasas maltogénicas, β -amilasas y amilogucosidasas. A pesar de que las α -amilasas se pueden utilizar como agentes que previenen el endurecimiento del pan, no son muy utilizadas porque una leve sobredosis de estas enzimas puede causar que el pan quede pegajoso. Para evitar esto se utilizan enzimas ramificantes junto con la α -amilasa. La pululanasa rápidamente hidroliza las maltodextrinas producidas por la α -amilasa. La pululanasa remueve los compuestos responsables de la gomosidad asociada al tratamiento con α -amilasas (Van der Maarel y col. 2001).

Formación de ciclodextrinas/ formación de cicloamilosa. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos únicos con enlaces α -1,4 que consisten principalmente de 6,7 y 8 residuos de glucosa (α -, β - ó γ - ciclodextrinas respectivamente). Los residuos de glucosa en el anillo son conformados de tal manera que el centro es hidrofóbico resultando en una cavidad apolar mientras que el exterior es hidrofílico.

Existen dos procesos industriales que son utilizados para la purificación de las ciclodextrinas: cristalización selectiva de β -ciclodextrina, que es relativamente poco soluble en agua y complejación selectiva por medio de disolventes orgánicos, con mayores desventajas por los riesgos de toxicidad, la flamabilidad y la utilización del disolvente. Para la producción industrial de ciclodextrinas, el almidón primero es licuado

con un calentamiento estable con α -amilasa y la ciclización ocurre con una ciclodextrin glicotransferasa de *Bacillus macerans* (Van der Maarel y col. 2001).

Otros usos. Las α -amilasas son utilizadas también para preparar disoluciones estables y viscosas utilizadas para formar las fibras textiles más resistentes, la clarificación de polisacáridos formados en jugos de frutas y cerveza ó el pretratamiento de alimento animal para incrementar su digestibilidad. Una creciente nueva área de aplicación de las α -amilasas es en el campo del lavado de vestido y detergentes utilizados para lavar la loza. Una práctica de lavado común es a bajas temperaturas, a estas temperaturas la remoción del almidón en la ropa y en la porcelana se dificulta. Los detergentes con α -amilasas que trabajan óptimamente a temperaturas moderadas y a pH alcalino pueden ayudar a resolver estos problemas.

Dos enzimas de la familia de la α -amilasas no han sido utilizadas a gran escala: la amilomaltasa y las enzimas ramificantes. Hay muchas patentes que describen el uso potencial de las enzimas ramificantes en pan como retardador del endurecimiento, sin embargo la aplicación de estas enzimas es limitada por la falta de enzimas comercialmente disponibles que sean suficientemente termoestables. Una aplicación industrial interesante de las amilomaltasas es la producción de geles de almidón reversibles. El almidón no puede ser disuelto en agua después de que se presenta la retrogradación. Sin embargo el almidón que ha sido tratado con amilomaltasa (*Thermus thermophilus*) ha mostrado tener características de gel termoreversible. Ha sido disuelto numerosas veces con sobrecalentamiento. Su comportamiento es similar al de la gelatina (Van der Maarel y col. 2001).

Clasificación

Las amilasas son enzimas que hidrolizan las moléculas de almidón para generar diversos productos incluyendo dextrinas y pequeños compuestos de unidades de glucosa (Figura 2) (Van der Maarel y col. 2001).

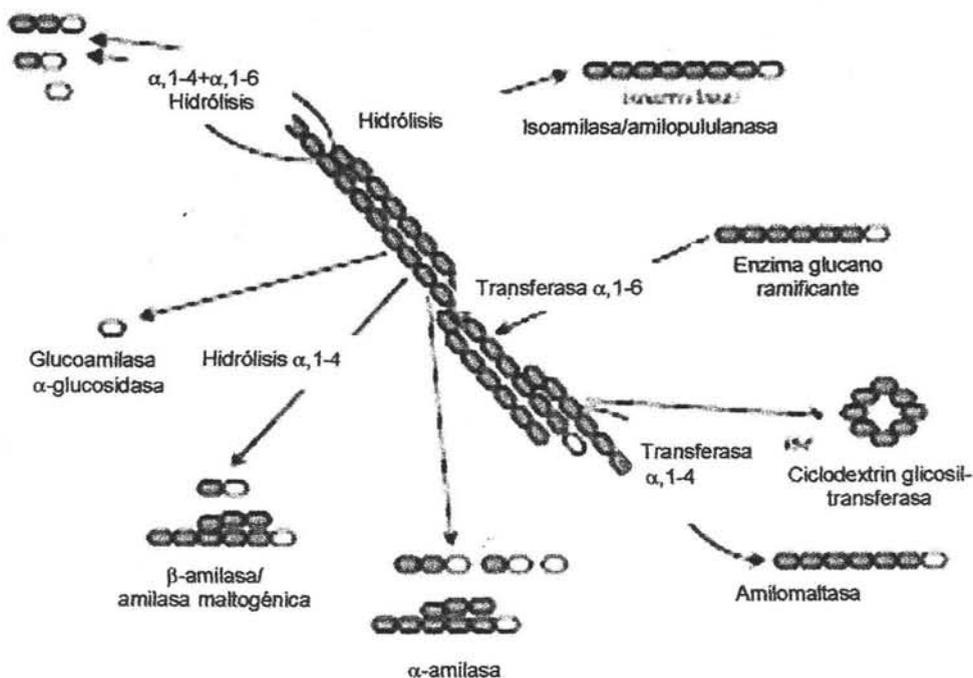


Figura 2. Diferentes enzimas que degradan el almidón. La estructura de anillo abierto simboliza el extremo reductor de una molécula de poliglucosa (Van der Maarel y col. 2001).

Las amilasas se clasifican en cuatro tipos principalmente:

1) Endoamilasas: Hidrolizan los enlaces glicosídicos α -1,4 presentes en la parte interna (endo) de la cadena de almidón o amilopectina. La α -amilasa es un ejemplo de estas enzimas, se encuentra en una amplia variedad de microorganismos. Los productos resultantes de la acción de la α -amilasa son oligosacáridos con diferente tamaño de cadena con configuración α y dextrinas α -límite que constituyen oligosacáridos ramificados.

2) Exoamilasas: actúan sobre los residuos de glucosa externa de amilosa o amilopectina y esto produce solo glucosa (glucoamilasa y α -glucosidasa), o maltosa (β -amilasa) y dextrinas límite.

a) Enzimas que solo pueden hidrolizar el enlace glicosídico α -1,4 como la β -amilasa.

b) Enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,4 y α -1,6 como la glucoamilasa o amiloglucosidasa.

La β -amilasa y glucoamilasa también convierten la configuración anomérica de la maltosa liberada de α a β .

3) Enzimas desramificantes: Exclusivamente hidrolizan el enlace glicosídico α -1,6 y forman un nuevo enlace α -1,6 por ejemplo: isoamilasa y pululanasa. La diferencia principal entre éstas dos es que la enzima pululanasa puede hidrolizar el pululano, un polisacárido con unidades repetidas de maltotriosa que tiene enlaces α -1,6, y además hidroliza la amilopectina, mientras que la isoamilasa solo puede hidrolizar los enlaces α -1,6 de la amilopectina.

4) Transferasas: Hidrolizan un enlace α -1,4 de la molécula donadora y transfieren parte del donador a un aceptor glicosídico con la formación de un nuevo enlace glicosídico. Las enzimas como la amilomaltasa y la ciclodextrin-glicosil-transferasa forman un nuevo enlace α -1,4 (Van der Maarel y col. 2001).

α -AMILASA

Muchas de las enzimas que hidrolizan el almidón pertenecen a la familia de las α -amilasas. Este grupo incluye a las enzimas que tienen las siguientes características:

- i) Actúan sobre el enlace α -glicosídico e hidrolizan este enlace para producir anómero α mono u oligosacáridos, forman enlaces α -1,4 o α -1,6 (transglicosilación) o una combinación de ambas actividades.
- ii) Tienen una estructura (β/α) o barril TIM, esta estructura contiene el sitio catalítico.
- iii) Tienen cuatro regiones conservadas en su secuencia primaria las cuáles contienen los aminoácidos que forman el sitio catalítico así como los aminoácidos que son esenciales para la estabilidad de la estructura de barril TIM (Van der Maarel y col. 2001).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD α -AMILOLÍTICA

Se han desarrollado diferentes métodos para detectar y medir la actividad amilolítica. Estos métodos están basados en 1) el incremento de grupos reductores, 2) cambios en el color de la reacción de almidón con yodo-yodurado, 3) decremento en la viscosidad y 4) un incremento en azúcares específicos (maltosa o glucosa) (Fogarty y Kelly, 1979).

a) Determinación de la actividad dextrinizante.

El almidón forma un complejo azul con el yodo y con la consecuente hidrólisis del almidón, cambia el color a rojo oscuro. Este método determina la actividad de la amilasa en términos del decremento del color en el yodo.

La porción de amilosa en el almidón es la responsable del color azul obtenido cuando se agrega yodo. Las unidades de D-glucosa en la cadena de amilosa están conformadas de manera helicoidal, por lo que los 6 anillos de piranosa forman una vuelta de la hélice dejando al halógeno ocupar la cavidad central de la estructura helicoidal. Se ha observado que las cadenas de 30 unidades de D-glucosa ó mayores

presentan color azul, de 8 a 12 unidades presentan color rojo y de 4 a 6 unidades no presentan color en presencia de yodo (Fogarty y Kelly, 1979).

Esta medición emplea almidón soluble como sustrato y una vez terminada la reacción se agrega HCl diluido para detenerla por completo, la disolución de yodo-yoduro se agrega después. El decremento en la absorbancia a 620 nm es medida contra un control. Un porcentaje de decremento en la absorbancia está considerado como una unidad enzimática. Este método tiene grandes ventajas como respuesta rápida, medición de muchas muestras, flexibilidad y utiliza aparatos simples.

b) Método de Sandstedt Kneen and Blish (SKB).

Es de los métodos más utilizados para medir la actividad amilolítica en la industria de panificación. Este método se utiliza para expresar la fuerza diastásica de la malta y no solo para expresar la actividad de la α -amilasa (Gupta y col. 2003).

c) Método de la farmacopea india.

Este método es utilizado para calcular la actividad de la amilasa en términos de gramos de almidón digerido por un volumen de enzima dado. Este procedimiento requiere de la incubación de la preparación con la enzima en distintas diluciones de la disolución amortiguadora a 40 °C durante 1 h. Estas disoluciones se tratan después con yodo-yoduro. El tubo que no registra ningún color azul es utilizado para calcular la actividad en términos de gramos de almidón digerido. Este método es empleado para estimar la actividad α -amilásica en cereales (Gupta y col. 2003).

d) Incremento en los azúcares reductores o método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

Este método determina el incremento en azúcares reducidos como resultado de la actividad de la α -amilasa sobre el almidón. El mayor defecto de este ensayo es que hay

un leve cambio de color producido y la destrucción de la glucosa por constituyentes del reactivo DNS. Para mejorar este método las sales de Rochelle fueron excluidas y se agrega 0.05 % de sulfato de sodio para prevenir la oxidación del reactivo (Gupta y col. 2003).

e) Decremento en la viscosidad de la suspensión de almidón.

Este método es utilizado en la industria de panificación para determinar la calidad de la harina y no sólo para determinar la actividad de la α -amilasa, y está basado en medir las propiedades reológicas de la masa. Los métodos que entran en esta categoría son el examen con amilógrafo, farinógrafo y el método (FN) Número de Decaimiento (Gupta y col. 2003).

PURIFICACIÓN DE α -AMILASAS

Las enzimas purificadas son un requisito para estudios de estructura función y relaciones entre propiedades fisicoquímicas. La purificación de proteínas es esencial para obtener estudios completos sobre ellas. Estos estudios pueden ser diversos y generalmente nos dicen cuanto de la proteína purificada es requerida, qué tan pura debe ser, y el tiempo y costo de la purificación. Para hacer una buena purificación se deben tomar en cuenta varios aspectos: se debe tomar la muestra del lugar donde la enzima sea más estable, se deben trabajar a baja temperatura, con condiciones que no afecten y puedan desnaturalizar la enzima. La purificación de enzima puede ser por separación basada en su estructura ó purificación por actividad.

La purificación de las α -amilasas que provienen de fuentes microbianas en muchos casos utiliza métodos clásicos. Estos métodos generalmente separan al cultivo del medio de crecimiento, se extrae la amilasa de interés por centrifugación si es extracelular ó por otros métodos más específicos si son intracelulares; muchos utilizan

la concentración selectiva por precipitación utilizando sulfato de amonio o disolventes orgánicos como acetona a -20 °C como un paso previo a la purificación. La enzima entonces es pasada por cromatografía generalmente de afinidad, intercambio de iones o filtración en gel (Gupta y col. 2003).

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Cromatografía es el nombre que reciben los métodos de separación molecular en los cuales dos ó más componentes de una mezcla son separados físicamente por distribución entre dos fases; una fase estacionaria, la cual puede ser un soporte sólido ó líquido y una fase móvil que puede ser un gas ó un líquido el cual fluye continuamente entre la fase estacionaria. En la cromatografía líquida la fase móvil es un líquido mientras que en la cromatografía de gases la fase móvil es un gas.

Las proteínas se adsorben en una variedad de fases sólidas, la adsorción depende de propiedades particulares de la proteína, lo que hace que sea selectiva (Hernández, 1987).

Los métodos más utilizados para el fraccionamiento de mezclas de proteínas hacen uso de Técnicas Cromatográficas en Columna, las cuales utilizan las diferencias entre propiedades de las proteínas tales como carga, tamaño ó unión a un sustrato.

Los elementos básicos de una cromatografía en columna son la fase estacionaria y la fase móvil. La fase estacionaria la forma un sólido poroso, el cual queda soportado en el interior de una columna generalmente fabricada en plástico o vidrio.

La fase móvil se encuentra formada por la disolución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La disolución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva disolución que se suministra desde un contenedor por la

parte superior de la columna. Los tres tipos de cromatografía utilizados más frecuentemente para separar proteínas son: Cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad (Nelson y col. 2002).

Cromatografía de Intercambio Iónico: La cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La matriz de la columna es un polímero sintético que contiene unidos grupos cargados (Nelson y col. 2002).

Cromatografía de Exclusión Molecular: La cromatografía de exclusión molecular, también llamada de filtración en gel, separa las proteínas en función de su tamaño. La matriz de la columna está formada por esferas de un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados. Las proteínas de mayor tamaño migran a lo largo de la columna más rápido que las de pequeño tamaño, ya que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las bolas de polímero y por tanto siguen una ruta más corta y directa a lo largo de la longitud de la columna. Las proteínas de menor tamaño, entran en los poros y su marcha a lo largo de la columna es lenta, ya que tienen que atravesar los laberintos que se encuentran en el interior de las bolas de polímero en su marcha a lo largo de la columna (Nelson y col. 2002).

Cromatografía de Afinidad: La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas protéicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando.

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción de receptores-ligandos, como son: antígeno/anticuerpo, hormona/receptor, inhibidor/enzima, lectina/ligando, enzima/sustrato y varios más. La técnica consiste en unir, de preferencia covalentemente, el ligando a una matriz inerte para la cual la proteína tiene cierta afinidad, lavar la columna ó el gel y después causar la disociación de la proteína de

interés por un cambio en las condiciones ambientales, lo cual causa un cambio reversible en la proteína y una reducción en la afinidad. Esta técnica es en la que se obtiene más rendimiento. Cromatografía de afinidad positiva es aquella que liga a la proteína de interés. Cromatografía de afinidad negativa es aquella que liga un contaminante. La disociación puede ser causada por un cambio único y gradual en la variable ambiental ó por un cambio gradual en el gradiente, lo que permite la elución sucesiva de especies moleculares parecidas. Primero el adsorbente y la disolución se ponen en contacto; al efectuarse la adsorción, el soluto se une perfectamente a la superficie del adsorbente. Una vez concluida la adsorción es necesario lavar la columna con una disolución que no provoque la desorción del soluto de interés, enseguida se efectúa la recuperación del soluto utilizando un fluido que favorezca la desorción (elución). La elución se lleva a cabo cambiando el pH, la fuerza iónica ó la composición química del buffer. Finalmente la columna es regenerada para poder utilizarla nuevamente (Uppsala, 1998).

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS α -AMILASAS.

Especificidad al Sustrato

La especificidad de las α -amilasas varía entre microorganismos. En general las α -amilasas tienen alta especificidad por el almidón, seguido por la amilosa, amilopectina, ciclodextrina, glicógeno y maltotriosa.

pH óptimo y estabilidad.

El pH óptimo de las α -amilasas varía de 2 a 12.

Las α -amilasas de la mayoría de las bacterias y los hongos tienen pH óptimos en intervalo ácido a neutro. La α -amilasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* muestra un pH óptimo de 3 en contraste con la amilasa alcalina con pH óptimo de 9-10.5 reportado de un *Bacillus sp.* Una enzima extremadamente alcalófila ha sido reportada de una bacteria del género *Bacillus sp.* con pH óptimo de acción de 11-12.

Temperatura óptima y estabilidad.

La temperatura óptima de actividad para la α -amilasa está relacionada con la temperatura de crecimiento del microorganismo.

La menor temperatura óptima reportada es de 25-30 °C para la α -amilasa de *Fusarium oxysporum* y la mayor temperatura reportada es de 100 °C y 130 °C, de *Pyrococcus furiosus* y *Pyrococcus woesei* respectivamente.

Peso Molecular

El peso molecular de las α -amilasas reportadas varía entre 10 y 210 kDa. El menor valor es de 10 kDa para *Bacillus caldolyticus* y el mayor peso molecular reportado es de 210 kDa reportado para *Chloroflexus aurantiacus*.

Inhibidores

Muchos cationes metálicos, especialmente de iones de metales pesados, EDTA (*Ácido etilendiaminotetraacético*), EGTA (*ácido tetraacético NNN'N'-etilen glicol-bis-2-aminoetiléter*), N-bromosuccinamida, iodoacetato, ácido p-hidroxil mercuribenzoico inhiben a las α -amilasas (Gupta y col. 2003).

Calcio y estabilidad de α -amilasas.

La α -amilasa es una metaloenzima que contiene al menos un ion Ca^{2+} por molécula de enzima. La fuerza del enlace del metal a la estructura de la proteína es dependiente del

origen de la enzima. La enzima requiere de este metal para su actividad catalítica. Las α -amilasas resisten más valores de pH y temperaturas extremas cuando están en presencia de Ca^{2+} , así como al tratamiento con urea ó exposición a proteasas como pepsina, tripsina, subtilisina y papaína. Las α -amilasas libres de calcio son altamente susceptibles a la desnaturalización por ácido, calor, urea y son rápidamente degradadas por pepsina (Fogarty y Kelly, 1979). La afinidad del Ca^{2+} a la α -amilasa es mucho más fuerte que hacia otros iones. Está reportado que hay excepciones, por ejemplo, la α -amilasa proveniente de *Aspergillus orizae* E1 212 es inactivada en presencia de Ca^{2+} pero retiene actividad después del tratamiento con EDTA. También hay casos reportados donde el Ca^{2+} no tiene ningún efecto sobre la enzima (*Pyrococcus furiosus*) (Gupta y col. 2003).

AMILASAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

Se han encontrado diferentes amilasas de bacterias lácticas. La α -amilasa de *Lactobacillus cellobiosus* D-39 es extracelular y fue aislada de ensilados de vegetales (Sen y Chakrabarty, 1987). La amilasa fue purificada por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de columna de celulosa DEAE y se obtuvo en forma cristalina. Es estable en pH neutro y es activa a 50 °C como máximo. El peso molecular de la amilasa fue de 22.5 kDa.

La α -amilasa de *Lactobacillus plantarum* cepa A6 es extracelular y fue aislada de yuca fermentada por (Giraud y col. 1993). La amilasa fue purificada por precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y por cromatografía de intercambio aniónico en una columna de celulosa DEAE. El peso molecular estimado fue de 50 kDa. Con la

determinación de la secuencia de aminoácidos se estimó que el peso molecular es de aproximadamente 100 kDa. Tiene un pH óptimo de 5.5 y temperatura óptima de trabajo de 65 °C, un valor de K_m de 2.38 g/l con almidón soluble como sustrato. La enzima se inhibió con N-bromosuccinamida, yodo y ácido acético. La energía de activación de la enzima fue de 30.9 kJ.

La distribución de la amilasa de *Streptococcus bovis* JB1 es dependiente del sustrato de crecimiento de la célula, si crece en maltosa, la amilasa es extracelular y si crece en almidón es asociada a la célula ó intracelular. La enzima extracelular fue aislada del rumen (Freer, 1993). Fue purificada por cromatografía de intercambio iónico (Mono Q). La enzima tiene un punto isoeléctrico de 4.5 y una masa molecular aparente de 77 kDa. La actividad de la α -amilasa en almidón soluble fue óptimo en el intervalo de pH 5 a pH 6. La enzima fue relativamente estable de pH 5 a pH 8.5 a temperaturas debajo de los 50 °C. La enzima tiene una K_m de 0.88 mg/mL.

Streptococcus bovis 148 produce dos amilasas una extracelular y otra intracelular. La α -amilasa de *Streptococcus bovis* 148 intracelular fue purificada por cromatografía de columna (DEAE-Sephacel) (Eichi y col. 1997). El peso molecular de la enzima purificada fue de 57 kDa. La masa estimada por filtración en gel fue de 55 kDa, lo que indicó que la amilasa intracelular existe en una forma monomérica. La enzima pura mostró su mayor actividad a pH 6.5 y 40 °C. La enzima se mantiene estable en pH neutro y comienza a perder actividad de pH 3 a 5 y a valores superiores de pH 8. La amilasa es sensible a temperaturas superiores a los 45 °C.

La α -amilasa de *Streptococcus mutans* es intracelular y fue encontrada en placa dental, siendo esta bacteria factor importante para la formación de caries dentales. La amilasa

fue estudiada por Simpson y col. (1998). La amilasa no fue purificada, pero se hicieron estudios sobre su función. Se encontró que la inactivación del gen que codifica para la producción de la amilasa intracelular no afecta el crecimiento de la bacteria ni afecta el grado de producción de ácido a partir de glucosa, maltosa, ó maltooligosacáridos. En contraste con lo que sucede cuando se inhibe la amilasa de *S. bovis*, donde si se retarda el crecimiento de la célula.

La amilasa producida por *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T es extracelular. Esta cepa se aisló en el proceso de producción de harina de almidón a partir de yuca fermentada en Colombia. La amilasa fue purificada primero con una ultrafiltración, se concentró la enzima con membranas Amicon y se purificó en una columna de celulosa DEAE. El peso molecular encontrado fue de 135 kDa. La temperatura y pH óptimos fueron 55 °C y 5.5 respectivamente y el punto isoeléctrico fue de 3.8. La enzima es estable entre valores de pH 5 y 6. La enzima fue sensible a la temperatura, perdiendo actividad en 1 h a 55 °C. La K_m y la energía de activación fueron 3.44mg/mL y 32.55kJ/mol, respectivamente. El Al^{3+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} (10 mm), inhibieron la actividad (Aguilar y col. 2000).

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33620 es extracelular y fue aislada de ensilados de maíz. El peso molecular de la enzima es de 140 kDa en extracto crudo, presenta actividad óptima entre pH 5 y 6. La amilasa es estable a altas temperaturas (50°C). Los iones Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} tienen un pequeño efecto estimulador en la amilasa (Castillo y col. 1993).

La α -amilasa de *Lactobacillus amylophilus* NRRL B-4437 es extracelular y fue aislada de ensilados de maíz. El peso molecular de la enzima es de 100 kDa en extracto crudo,

presenta actividad óptima entre pH 5 y 6. La amilasa es estable a altas temperaturas (40 °C). Los iones Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} tienen efecto inhibitorio sobre la amilasa (Castillo y col. 1993).

La amilasa de *Streptococcus infantarius* 25124 es asociada a la célula. En estudios en extracto celular se encontró que es una α -amilasa, con peso molecular de 200-250 kDa, su pH óptimo de acción es 6.6 a una temperatura de 37 °C (Díaz, 2003).

IV. HIPÓTESIS

Será posible purificar la amilasa producida por la bacteria *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* 25124 por medio de cromatografía de afinidad.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Purificar la amilasa producida por la bacteria *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* 25124 aislada del pozol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✦ Proponer una metodología que permita la liberación de la amilasa de la célula y la separación del resto de las proteínas del extracto.
- ✦ Determinar el peso molecular de la amilasa.

VI. METODOLOGÍA

Descripción de la cepa.

Se usó la cepa *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* 25124 aislada del pozol (Díaz, 2003).

Etapa 1. Separación y purificación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 a partir de células congeladas.

1. Células congeladas.

Las condiciones de crecimiento de la cepa *S. infantarius* 25124 fueron las siguientes: la fermentación se realizó en un fermentador Bio Flo 111 con capacidad de 5 L, con agitación continua a 75 rpm, a una temperatura de 37 °C y a un pH constante de 6.6 en medio MRS-almidón (Anexo I). La fermentación duró 12 horas (Flores, 2003).

Las células se separaron del medio de crecimiento centrifugando los cultivos (15,000 rpm, 4 °C, 15 minutos). Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril y la biomasa se conservó a -20 °C seis meses antes de que fuera utilizada.

2. Prueba de actividad amilolítica en células congeladas.

La actividad amilolítica de las células se realizó por medio de la técnica de extinción del complejo almidón-yodo, a pH y temperatura óptimos de la enzima en el extracto celular (pH 6.6 y 37 °C) (Díaz, 2003).

Dentro de una celda desechable se agregaron 2.4 mL de la disolución yodo-yoduro al 4 %. Se agregó 0.1 mL de la muestra a analizar (siempre en hielo) y se agitó vigorosamente. Se leyeron los valores de absorbancia a 620 nm y se relacionaron con la curva patrón de almidón (Anexo IV) (en todos los casos se utilizó almidón soluble de

papa Prolabo-Merck Eurolab), los controles o blancos de agua destilada se trataron de la misma forma.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Fórmula 1).

3. Pruebas de liberación de la amilasa.

a) Tratamiento con Tritón X-100 (Lindgren, 1984).

Se tomaron 1.5 mL de células congeladas y se ajustó el pH a 3.5 con HCl (370 g/L, p/v), posteriormente se agregó Tritón X-100 (Sigma X-100) (0.1 g/L) y se agitó vigorosamente por 2 h a 5 °C. Después el pH fue ajustado (Jenway 3020) a 5.0 con hidróxido de sodio (10 M). Las células tratadas se dializaron (membrana SpectroPor PM 50,000) (Anexo II) contra 1000 mL de disolución amortiguadora de fosfatos/citratos pH 6.6, 0.1 M durante 15 h a 6 °C con un cambio de buffer. La suspensión celular se centrifugó (Beckman J2-21E) a 15,000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C, se separó el sobrenadante del precipitado y éste se ajustó con agua destilada al mismo volumen de sobrenadante obtenido. Las muestras del sobrenadante y precipitado se guardaron en congelación. Se midió la actividad amilolítica en sobrenadante y precipitado mediante la técnica de extinción del complejo almidón-yodo.

b) Tratamiento con sonda de ultrasonido (Díaz, 2003).

Se trataron 2 mL de células congeladas con lisozima 4 mg/mL (Sigma L- 6751) en 3 mL de disolución amortiguadora TS (Tris-HCl 50 mM; pH 8; sacarosa 25 %) durante 1h a 37 °C. Los protoplastos se recuperaron centrifugando (15 min, 15,000 rpm, 4°C), y se resuspendieron en 10 mL de disolución de rompimiento (disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y mezcla inhibidora de proteasas Roche 1/100 volumen final). La suspensión de protoplastos se puso en microtubos de

1.5 mL. Los protoplastos se rompieron con sonda de ultrasonido (Fisher 550), con las siguientes condiciones: 5 ciclos de 20 mHz con ciclos de enfriamiento intermedios. Los protoplastos rotos se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C, se separó el sobrenadante del precipitado, y el precipitado se ajustó con agua destilada al mismo volumen de sobrenadante obtenido. Las muestras del sobrenadante y precipitado se guardaron en congelación. Se midió la actividad amilolítica en sobrenadante y precipitado mediante la técnica de extinción del complejo almidón-yodo.

c) Tratamiento con urea (Olivares y col. 2002).

Se suspendió 1 mL de células congeladas en 5 mL de urea (Sigma U-6504) 8 M a 25 °C con agitación suave y ocasional. Inmediatamente después la suspensión celular fue dializada (membrana SpectroPor PM 50,000) (Anexo II) contra 1,000 mL de disolución amortiguadora de fosfatos/citratos 0.1 M, pH 6.6, durante 15 h a 6 °C con agitación constante y un cambio de buffer. Transcurrido el tiempo, la suspensión celular se centrifugó por 15 minutos a 15 000 rpm y 4 °C. Se separó el sobrenadante del precipitado, y éste se ajustó con agua destilada al mismo volumen de sobrenadante obtenido. Las muestras del sobrenadante y precipitado se guardaron en congelación. Se midió la actividad amilolítica en sobrenadante y precipitado mediante la técnica de extinción del complejo almidón-yodo.

d) Tratamiento con Tris-Sacarosa.

Se trataron 2 mL de células congeladas con 3 mL de disolución amortiguadora TS (Tris-HCl 50 mM; pH 8; sacarosa 25%) durante 1 hora a 37 °C. Las células tratadas se centrifugaron a 15 000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C. Se separó el sobrenadante del precipitado, el precipitado se ajustó con agua destilada al mismo volumen de sobrenadante obtenido. Las muestras del sobrenadante y del precipitado se guardaron

en congelación. Se midió la actividad amilolítica en sobrenadante y precipitado mediante la técnica de extinción del complejo almidón-yodo.

4. Mejoramiento del rendimiento de la extracción de la amilasa por medio de urea 8 M.

Con el fin de mejorar el rendimiento de la liberación de la amilasa por medio del método con urea se hicieron pruebas con 5 mL de urea 8 M y se agregaron diferentes cantidades de suspensión celular.

5 mL de urea 8 M +

- 1 mL de suspensión celular
- 2 mL de suspensión celular
- 3 mL de suspensión celular
- 3.5 mL de suspensión celular

5. Determinación de Proteína.

Las proteínas absorben a 280 nm únicamente por los residuos de tirosina y triptofano (a menos que también contengan grupos prostéticos que absorban en el intervalo de UV). Debido a que la cantidad de estos 2 aminoácidos varía enormemente de una proteína a otra, el coeficiente de extinción usualmente expresado como $E_{280}^{1\%}$ ó $E_{280}^{1\text{mg/mL}}$ varía considerablemente. La absorción a 280 nm da sólo una idea del contenido de proteína real, excepto en el caso de proteínas puras donde se conoce el coeficiente de extinción (Scopes, 1994).

Se determinó proteína midiendo la muestra directamente a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Spectronic 21D.

6. Prueba de purificación de la amilasa en extracto celular obtenida a partir de la liberación de la enzima de células congeladas con urea.

Con el fin de determinar si la amilasa de *S. infantarius* 25124 podía ser purificada a partir de sefarosa 6- β epoxiactivada (Sigma 6B-100) por medio de cromatografía de afinidad, se realizó una metodología de prueba descrita a continuación.

1. La sefarosa se lavó en microtubos de 1.5 mL con agua destilada 10 veces (centrifugación a 1,600 rpm, 3 minutos a temperatura ambiente en equipo eppendorf 5415 D).
2. Se preparó la β -ciclodextrina (Sigma C4767) a una concentración de 8 mg/mL.
3. Se agregó la muestra (dializado del sobrenadante obtenido en el tratamiento con 5 mL de urea 8 M más 3.5 mL de suspensión celular) dispersando la sefarosa en el medio, se dejó en agitación muy suave durante 30 minutos.
4. Se recuperó la sefarosa con la enzima y se apartó el sobrenadante.
5. Se lavó la sefarosa con la disolución amortiguadora de fosfatos 10 veces a 4000 rpm, 5 min cada vez a temperatura ambiente.
6. Se agregó 1 mL de β -ciclodextrina y 20 μ L de inhibidor de proteasas 10 mg/mL, se agitó 5 minutos, y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min cada vez a temperatura ambiente.

7. Evaluación de la prueba de purificación de la amilasa obtenida a partir de células congeladas.

Para la evaluación de la purificación se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Las migraciones se llevaron a cabo con corriente eléctrica de 90 V por 1 hora 45 minutos. Para observar la presencia de las proteínas separadas se realizó una tinción

por medio de nitrato de plata (Silver Stain Plus de BIORAD), y para detectar la actividad amilolítica en los geles se realizó un zimograma (Anexo III) (Lacks y Springhorn, 1980).

El equipo utilizado fue de electroforesis vertical (MiniProtean 3 de BIORAD).

Se midió actividad amilolítica por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo.

Etapas 2. Separación y purificación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 a partir de células recién cultivadas.

1. Activación de la cepa.

A partir de cultivos puros conservados a -70 °C en perlas de vidrio y glicerol al 20 %, se activó la cepa tomando una perla para depositarla en un tubo con 5 mL de caldo MRS-glucosa (Oxoid L37) e incubarlo por 24 horas a 30 °C. Las cepas que se activaron en caldo MRS-glucosa se conservaron a -70 °C en tubos de plástico de 1.5 mL que contenían 0.75 mL de glicerol al 80% y 0.75 mL del cultivo.

2. Obtención de extractos celulares cultivados.

La reactivación de las cepas se realizó inoculando 500 µL del cultivo congelado en 4.5 mL de medio MRS-almidón (Anexo I), el cual se incubó a 30 °C durante 18 h. Se agregaron 2.5 mL del cultivo reactivado a 25 mL de medio MRS-almidón y se incubaron durante 18 h a 30 °C para obtener un precultivo. Se tomaron los 25 mL del precultivo y se agregaron a 225 mL de medio MRS-almidón, se incubó el medio durante 6 h a 30 °C en condiciones estáticas. Al término de la fermentación se separaron las células del medio de crecimiento mediante centrifugación (15,00 rpm, 4 °C, 15 min) y las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril.

3. Pruebas de liberación de la amilasa.

La liberación de la amilasa de las células de *S. infantarius* subespecie *infantarius* 25124 recién cultivadas se realizó con las mismas metodologías utilizadas en la etapa 1: Tritón X-100, Sonicación, Urea y Tris-Sacarosa.

4. Preparación de la muestra para la purificación.

Una vez dializada la muestra, se filtró con equipo Millipore (Filtro de Vidrio XX1004700, Embudo XX1004704) y membrana (Millipore HVLPO4700-259, tamaño de poro 0.45 μm y diámetro de 4.7 cm.) y se guardó a 4 °C durante 12 horas.

5. Preparación de la columna para purificación.

1. Inmovilización de la β -ciclodextrina.

Se resuspendieron 4 g de sefarosa 6- β -epoxiactivada (Pharmacia) en 25 mL de agua destilada durante 1 h.

2. Se lavó en un vaso de vidrio con filtro número 3 (1 h con 400 mL de agua destilada).

3. Se transfirió el gel a 25 mL de NaOH 0.1 M conteniendo 0.3 mM de β -ciclodextrina (Sigma C4767). Se agitó durante 19.5 horas a 45 °C (evitando la agitación magnética) (Agitador Orbital Brunswick Scientific G-76).

4. Para finalizar la reacción los grupos restantes se bloquearon transfiriendo el gel a la disolución amortiguadora etanol-amina-HCl pH 8. Se dejó a 40 °C–50 °C toda la noche.

5. Se lava con agua destilada 30 minutos.

6. Se bloquearon los radicales activos que no hubieran reaccionado con 200 mL de disolución de glucosa al 2.5 % 30 minutos.

7. Se lavó con agua destilada 30 minutos y después se hicieron 3 lavados sucesivos con 100 mL de disolución amortiguadora de boratos 0.1 M pH 8, NaCl 0.5 M y 100 mL de disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 4, NaCl 0.5 M.

8. El gel de β -ciclodextrina-sefariosa-6- β se amortiguó con buffer citratos/fosfatos 0.1 M pH 6.6.
9. Se cargó el gel en la columna de vidrio (Pharmacia XK16, diámetro interno 16mm y longitud 20 mm).
10. Se equilibró la columna.

6. Purificación de la amilasa de *S. infantarius* a partir de células recién cultivadas.

1. Una vez colocada la columna en el equipo de cromatografía líquida de alta Resolución (FPLC ÄKTAprime 01117322) se hicieron pasar 100 mL de disolución amortiguadora de fosfatos/citratos 0.1 M pH 6.6.
2. Se pasó por la columna la muestra a purificar (extractos celulares de *Streptococcus infantarius* 25124), previamente dializada, filtrada por membrana 0.45 μ m y desgasificada. Se lavó la columna con buffer fosfatos/citratos pH 6.6 0.1 M hasta que la DO (densidad óptica) de salinidad fue cero.

Para eluir la proteína se utilizó β -ciclodextrina 8 mM. Todas las disoluciones fueron filtradas con membrana 0.45 μ m y desgasificadas antes de ser utilizadas.

7. Estimación del peso molecular y evaluación de la purificación.

El peso molecular de la enzima pura y en el extracto celular se estimó por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970). El equipo utilizado fue de electroforesis vertical (MiniProtean 3 de BIORAD).

Las migraciones se llevaron a cabo con corriente eléctrica de 90 V por 1 hora 45 minutos. Para observar la presencia de las proteínas separadas se realizó la tinción de los geles por medio de nitrato de plata (Silver Stain Plus de BIORAD), y para detectar la

actividad amilolítica en los geles se realizó un zimograma (Anexo III) (Lacks y Springhorn, 1980).

8. Determinación de Proteína.

Se determinó proteína midiendo a 280 nm en un espectrofotómetro UV/vis Agilent 8453E.

9. Métodos de concentración de la amilasa.

a) Concentración de la amilasa por filtración (Microcon YM-10).

Esta técnica consiste en la retención de la enzima en una membrana de celulosa con tamaño de poro específico y la separación de la enzima de otras proteínas que puedan estar presentes y que tengan un menor tamaño que el del poro de la membrana. Una vez concentrada la enzima en la membrana se resuspende en un volumen más pequeño.

Las especificaciones del equipo utilizado son las siguientes:

Microcon YM-10 de Millipore, diámetro 12.3 mm, área activa de membrana 0.34 cm², longitud de concentración de la muestra 45 mm, tamaño de poro de la membrana 10,000.

Procedimiento:

1. Se lavó el microcon 2 veces con agua desionizada, filtrada y fría por medio de centrifugación (Hermle 2160M) 5 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente.
2. Se colocaron 500 µL de la muestra a concentrar en el microcon, se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente.
3. Se lavó 2 veces la membrana con agua desionizada, estéril y fría por medio de centrifugación 5 minutos cada vez a 10,000 rpm a temperatura ambiente.

4. Se agregaron 200 μL de agua desionizada, filtrada y fría, se lavó la membrana, se recolectaron los 200 μL y se almacenaron para medir actividad y cantidad de proteína.

Se determinó la actividad amilolítica de la amilasa pura antes y después del tratamiento por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo. Se determinó la cantidad de proteína presente midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectro Agilent 8453E.

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) para ver los posibles cambios de la enzima.

b) Concentración de la amilasa (Speed Vac SPD1010 SpeedVac™ System de Thermo Savant).

Esta metodología se basa en la evaporación del agua por la alta velocidad de centrifugación y la fricción de la superficie superior del agua con el aire.

Antes de realizar la concentración se dializaron (membrana SpectroPor 7 PM 50,000) 5 mL de la muestra purificada durante 12 h a 6 °C contra 1000 mL de agua destilada, filtrada con equipo millipore y membranas de 0.45 μm . La concentración se realizó con el equipo SPD1010 SpeedVac™ System de Thermo Savant, con las siguientes condiciones: 15,000 rpm 10 minutos cada vez con ciclos de enfriamiento de 2 minutos en hielo, hasta que el volumen de cada uno de los microtubos con 1 mL se redujo al 20 % del volumen original.

Se determinó la actividad amilolítica de la amilasa pura antes y después del tratamiento por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo. Se determinó la cantidad de proteína presente midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectro Agilent 8453E.

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) para ver los posibles cambios de la enzima y se guardó a -70 °C.

c) Concentración de la amilasa (liofilización LABCONCO 409188).

Se dializaron (membrana SpectroPor 7 PM 50,000) 5 mL de muestra purificada durante 4 h contra agua destilada y filtrada con equipo millipore y membranas de 0.45 µm, a 6 °C. La muestra dializada se colocó en 5 microtubos con capacidad de 1.5 mL con 1 mL cada uno y se congelaron las muestras a -70 °C durante 2 horas antes de ser liofilizadas.

Por otro lado, se pusieron 5 mL de la muestra purificada sin dializar en 5 microtubos de 1.5 mL con 1 mL de muestra cada uno y se congelaron durante 2 h a -70 °C antes de ser liofilizadas. La liofilización se realizó en un equipo (LABCONCO 409188) durante 22 h la muestra dializada y durante 36 h la muestra sin dializar. El liofilizado se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril y se almacenó a -70 °C.

Se determinó la actividad amilolítica de la amilasa pura antes y después del tratamiento por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo. Se determinó la cantidad de proteína presente midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectro Agilent 8453E.

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) para ver los posibles cambios de la enzima.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapla 1. Separación y purificación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 a partir de células congeladas.

Actividad amilolítica en las células congeladas de *S. infantarius* 25124.

Para corroborar que las células almacenadas por 6 meses en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tuvieran actividad amilolítica asociada a la célula, se midió la actividad de éstas por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo (Metodología Etapa 1. 2) obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 1. Actividad amilolítica asociada a las células congeladas de *S. infantarius* 25124. Dilución 1/10 y 2/10.

Muestra	Abs t0	Abs t10	Abs t0- Abs t10	Actividad amilolítica U/mL
Suspensión celular diluida 1/10	0.6575	0.458	0.1995	5.4079
Suspensión celular diluida 2/10	0.642	0.3605	0.2815	7.6308

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos al medir la actividad amilolítica de *S. infantarius* 25124, ésta nos muestra que existe actividad asociada a la célula. Al tener una dilución al doble de la otra, esperábamos tener el doble de actividad amilolítica en la dilución 2/10, sin embargo esto no sucedió. La actividad amilolítica en la dilución 2/10 es sólo el 70 % de la actividad esperada. Esto pudo suceder porque las células congeladas no se encontraban homogéneamente distribuidas y aunque fueran agitadas formaban grumos muy difíciles de pipetear y en otras zonas estaban perfectamente diluidas en agua.

Pruebas de liberación de la amilasa.

Con el fin de liberar la amilasa de la célula se probaron tres metodologías: tratamiento con Tritón X-100, tratamiento con urea 8 M y sonicación.

Se evaluaron las tres metodologías a través de la medición de actividad amilolítica en el sobrenadante (enzima liberada) y en el precipitado (actividad remanente asociada a la célula) (Tabla 2). La presencia de la proteína de interés se observó al realizar la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) (Figura 3).

Tabla 2. Evaluación de los tres métodos utilizados en la liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124.

Método de extracción de la amilasa	Actividad liberada U/mL	Actividad remanente en la célula U/mL
Urea 8 M	3.630	6.776
Tritón X-100	2.330	5.983
Sonicación	5.042	6.831

La Tabla 2 nos muestra que la actividad remanente asociada a la célula es mayor en los tres métodos de liberación de la amilasa que la actividad liberada en el sobrenadante.

Si la proteína se centrifuga a 100,000 g por 60 minutos, se puede considerar que ya está dispersa en el sobrenadante, sin embargo puede estar todavía asociada con micelas de detergente ó parcialmente agregada con otras proteínas de membrana que quedan en el precipitado (Scopes, 1994), esto pudo haber sucedido con la muestra ya que se obtuvo una mayor cantidad de actividad amilolítica en el precipitado que en el sobrenadante.

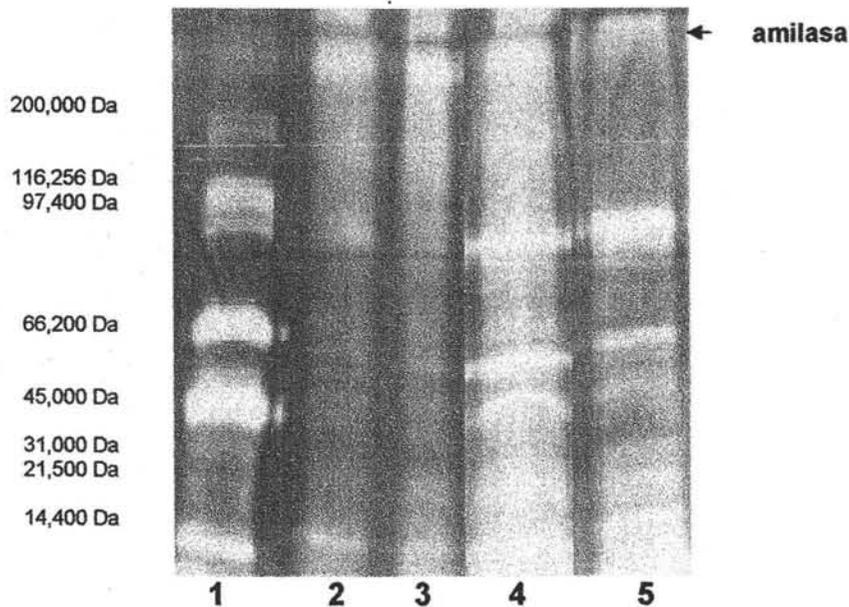


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, de la amilasa de *S. infantarius* 25124 liberada por tres diferentes métodos. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (BioRad Broad Range), **carril 2:** sobrenadante del tratamiento con urea 8 M dializada después de 17 h de reposo en refrigeración, **carril 3:** sobrenadante del tratamiento con urea dializada inmediatamente, **carril 4:** sobrenadante del tratamiento con tritón X-100, **carril 5:** sobrenadante obtenido después del tratamiento por sonicación, **amilasa:** proteína de interés.

En la Figura 3 se observa el perfil de proteínas obtenido con los tres métodos de liberación de la amilasa utilizados; en los carriles 2 y 3 se observa, (tratamientos con urea), que la cantidad de proteínas presentes es menor comparada con el carril 4 (tratamiento con Tritón X-100) y 5 (sonicación), lo cual facilita la purificación de la amilasa; también se observa una banda más intensa en la posición donde se encuentra la banda de interés en los carriles 2 y 3. Generalmente la intensidad de color de una banda está relacionada con la concentración de la proteína teñida. A mayor intensidad de color de la banda hay mayor concentración de proteína.

El método de liberación de proteínas de membrana utilizando urea 8 M fue utilizado por Olivares (2002) para liberar una fructosiltransferasa asociada a la célula de una bacteria láctica (*Leuconostoc citreum*) aislada del pozol. Después del tratamiento con urea la

mayoría de la actividad inulosucrasa fue perdida, sólo el 10 % de la actividad inicial en todas las células fue recuperada en el sobrenadante. Esto se asemeja al resultado obtenido al liberar la amilasa por este método, se recupera poca actividad en el sobrenadante y queda más en el precipitado, pero en general se pierde una gran cantidad de actividad durante el proceso (90 %). Las células de *L. citreum* y el sobrenadante obtenido después del tratamiento fueron analizados por SDS-PAGE y se encontró que sólo la proteína de interés fue solubilizada por la disolución de urea. En este caso encontramos aparte de la amilasa de interés otras 6 proteínas de menor peso molecular presentes después el tratamiento con urea (Figura 3).

El método utilizando Tritón X-100 para liberar enzimas de membrana fue utilizado por Lindgren (1983) para liberar una amilasa asociada a la célula de una bacteria láctica (*Leuconostoc*) aislada de un alimento de pescado obteniéndose suficiente enzima para caracterizarla. Sin embargo en este trabajo el método de Tritón X-100 fue el menos efectivo siendo el que menos cantidad de amilasa asociada a la célula de *S. infantarius* logró liberar. El Tritón X-100 es un detergente no iónico ampliamente utilizado para liberar las enzimas que se encuentran en la membrana celular. Los tratamientos con detergentes pueden causar que la membrana se fragmente en pequeñas vesículas con la proteína todavía en forma insoluble, pero no se sedimenta excepto a una alta fuerza *g*. Se puede decir que el problema de la extracción con Tritón X-100 no fue de cantidad, debido a que se recomienda utilizar como mínimo 2 mg de detergente por 1 mg de membrana que se desee retirar, y se utilizó el Tritón en concentración suficiente para desintegrar la membrana.

El método de sonicación es un método muy vigoroso que es a microescala y que utiliza ondas de sonido causando trastornos por fuerzas de corte y cavitación (Scopes,

1994). Este fue el método con el que se liberó mayor cantidad de actividad amilolítica debido a que destruye la célula y las proteínas de ésta quedan en el extracto.

Mejoramiento del rendimiento de la extracción de la amilasa por medio de urea 8 M.

Dada la facilidad y eficiencia del tratamiento con urea (Figura 3), se seleccionó esta metodología para la extracción de la amilasa en los experimentos posteriores. Con el fin de aumentar la actividad amilolítica liberada se incrementó el volumen de suspensión celular en dicho tratamiento. Se observó que la actividad amilolítica aumenta al incrementarse el volumen de la suspensión celular en una misma cantidad de urea (5 mL) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la cantidad de suspensión celular en la actividad amilolítica liberada con el tratamiento de urea 8 M.

Condiciones de liberación de la amilasa: 5 mL de urea +	Actividad U/mL
1 mL suspensión celular	4.002
2 mL suspensión celular	4.9899
3 mL suspensión celular	6.2239
3.5 mL suspensión celular	10.127

La presencia de la proteína de interés se observó al realizar la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Figura 4).

Al aumentar la cantidad de suspensión celular en una misma cantidad de urea 8 M (5 mL), se observa que aumenta también la cantidad de proteínas presentes en el sobrenadante. Dicho aumento pudo deberse a la saturación de los poros de la membrana de diálisis con la biomasa, la misma biomasa pudo haber tapado el poro de la membrana y evitar así el intercambio de disoluciones de adentro hacia fuera de la

membrana y viceversa dejando los restos celulares grandes y pequeños dentro del dializado. Además no se observó de manera clara la amilasa de interés.

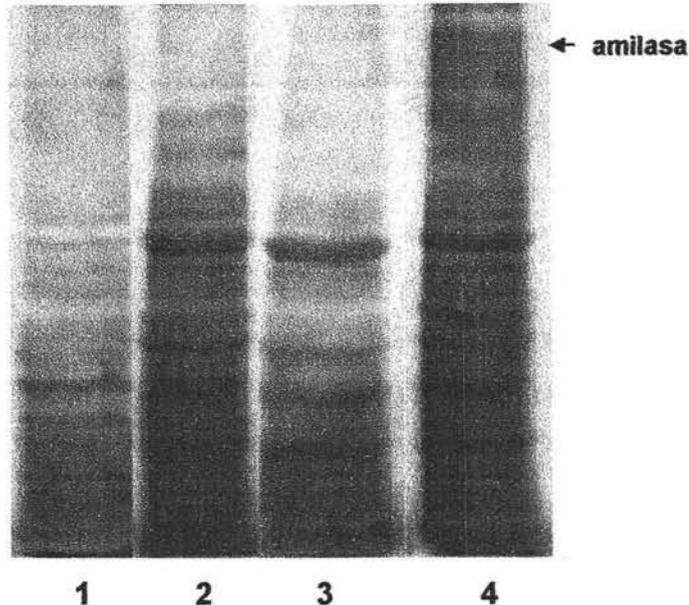


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, del sobrenadante resultante de la liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 en 5 mL de urea 8 M aumentando la cantidad de suspensión celular. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. **Carril 1:** tratamiento con 5 mL de urea 8 M + 1 mL de suspensión celular. **Carril 2:** tratamiento con 5 mL de urea 8 M + 3 mL de suspensión celular. **Carril 3:** tratamiento con 5 mL de urea 8 M + 2 mL de suspensión celular. **Carril 4:** tratamiento con 5 mL de urea 8 M + 3.5 mL de suspensión celular.

La urea es un agente muy agresivo que pudo haber afectado la integridad de la amilasa degradándola ó afectando su sitio catalítico, por lo cual no se observa la amilasa de manera clara en el gel de proteínas. En el zimograma que se realizó no se observó zona de actividad amilolítica.

Prueba de purificación de la amilasa en extracto celular obtenida a partir de la liberación de la enzima de células congeladas con urea.

El siguiente paso fue la purificación de la enzima. Para saber si la amilasa de *S. infantarius* 25124 podía ser purificada a partir de sefarosa 6- β epoxiactivada por medio

de cromatografía de afinidad, se realizó una metodología de prueba uniendo la amilasa a sefarosa-6- β -epoxiactivada acoplada a β -ciclodextrina en microtubos de 1.5 mL (Metodología Etapa 1. 6). Para realizar ésta se utilizó el sobrenadante obtenido en el tratamiento con 5 mL de urea 8 M más 3.5 mL de suspensión celular que es donde se obtuvo más actividad amilolítica. Con la finalidad de ver si la enzima estaba presente después de la purificación se realizó la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), (Figura 5).

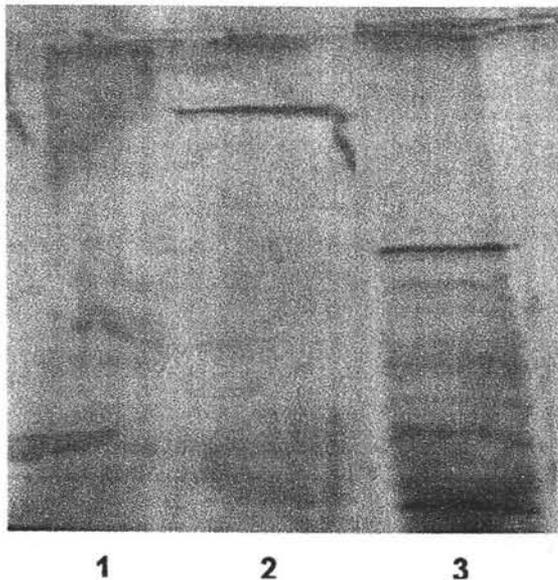


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, después de la prueba de purificación de la enzima con sefarosa-6 β -epoxiactivada acoplada a β -ciclodextrina. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. Carril 1 y 2: Amilasa pura, carril 3: Aguas residuales (muestra recuperada después de unir a β -ciclodextrina).

La purificación de la amilasa por medio de urea no fue eficiente ya que no se detectó la proteína de interés (Figura 5; carril 1 y 2). En las aguas residuales (carril 3), que es la muestra inicial recuperada después de haber realizado la purificación, se encuentran varias proteínas de peso molecular bajo. A pesar de que en el zimograma no se observó actividad y en el gel de proteínas no se encuentra la banda correspondiente a la amilasa, al realizar el ensayo de actividad amilolítica por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo se encontró que el valor de actividad de la enzima pura fue de: 1.0731 U/mL. El método de extinción de almidón-yodo nos permite medir

concentraciones bajas de actividad amilolítica y pueden ser medidas cadenas de glucosa desde 8 a 12 unidades presentando color rojo (Fogarty y Kelly, 1979), sin embargo el tratamiento previo a la tinción pudo influir en la tinción con nitrato de plata ó el tiempo de tinción no fue suficiente para ver la banda de la proteína.

Evaluación durante 1.5 meses de la actividad amilolítica de la amilasa liberada por medio de urea 8 M y por sonicación.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la enzima al ser liberada por urea y sonicación se hizo un seguimiento en un periodo de tiempo de 1.5 meses de la actividad amilolítica de la enzima liberada, el método utilizando Tritón X-100 lo descartamos por liberar poca actividad amilolítica de la enzima (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad amilolítica de la enzima liberada con el tratamiento de urea y sonicación en células congeladas.

Método de liberación de la amilasa	Actividad U/mL sobrenadante^a	Actividad U/mL sobrenadante^b	Actividad U/mL sobrenadante^c	Actividad U/mL sobrenadante^d
Urea	3.63	3.63	1.68	0.15
Sonicación	5.042	5.5	4.9	4.95

^asobrenadante evaluado el mismo día en que se hizo el tratamiento, ^bsobrenadante almacenado en congelación 8 días, ^csobrenadante almacenado en congelación 12 días, ^dsobrenadante almacenado en congelación 1.5 meses.

Con el método de liberación de la amilasa por medio de urea, la actividad amilolítica decrece rápidamente al paso de tiempo, y prácticamente se pierde toda después de 1.5 meses. La actividad enzimática permanece prácticamente constante cuando se libera por medio de sonicación, por lo cual se trabajó con sonicación a partir de ese momento. La urea es un agente careotrópico que es muy agresivo con las proteínas y la concentración de urea que utilizamos para la liberación de la amilasa fue de 8 M, este

fue un tratamiento drástico para la célula, y a pesar de que la enzima se encuentre presente, puede ser que pierda su actividad biológica como resultado de la extracción, además seguramente la diálisis realizada fue deficiente porque la enzima siguió perdiendo actividad a lo largo del tiempo. La concentración de urea con la que se trabajó es muy alta y solamente se realizó un cambio de buffer, sin embargo el tiempo que se dejó en diálisis fue de 12 horas, tiempo suficiente para que el sistema se equilibre (Scopes, 1994). Si la cantidad de disolución amortiguadora no fue suficiente para dejar la urea en muy baja concentración ó eliminarla por completo, la urea pudo estar presente en todo el periodo de almacenamiento y causar daño a la célula.

Evaluación del método de sonicación para la liberación de la amilasa de células congeladas de *S. infantarius* 25124.

Se realizó una evaluación de la actividad liberada en cada uno de los pasos llevados a cabo a través del tratamiento de sonicación (Tabla 5), y se observa que hay actividad en todas las etapas de las que consiste este tratamiento.

Tabla 5. Evaluación del método de sonicación para la liberación de la amilasa de células congeladas de *S. infantarius* 25124.

Paso	Paso de extracción	Actividad amilolítica (U/mL)
1	Sobrenadante del extracto celular tratado con TS (Tris pH 8, sacarosa 25 %).	13.5
2	Sobrenadante del extracto celular tratado con lisozima y con TS (Tris pH 8, sacarosa 25 %) a 37 °C.	12.6
3	Sobrenadante después de la sonicación (amilasa liberada).	2.52
4	Precipitado después de la sonicación (amilasa asociada a la célula).	10.88

Con la finalidad de observar el perfil de proteínas que se tiene a lo largo del método de sonicación se realizó la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 6 y 7).

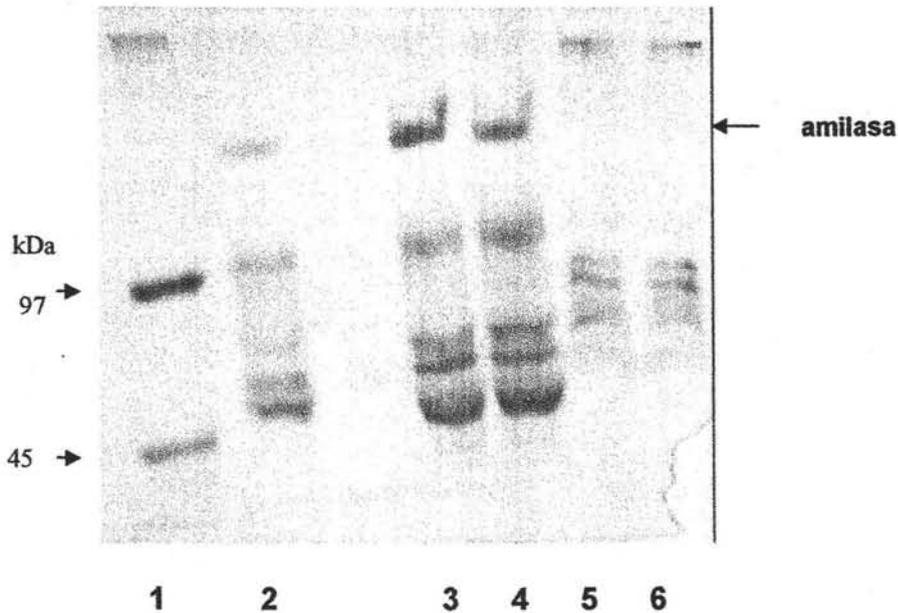


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, del proceso de liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio de sonicación. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. Carril 1: Marcador Molecular Broad Range (BioRad), carril 2: Tratamiento con TS y dializado durante 18 h carril 3 y 4: Tratamiento con lisozima y TS, carril 5 y 6: Sobrenadante final del ultrasonido completo.

En los cuatro pasos de liberación de la amilasa por medio de sonicación se observan las bandas correspondientes a la amilasa de interés 250 kDa y además en todas ellas se observa el mismo perfil de proteínas (Figura 6), lo que indica que las proteínas de la célula se encuentran libres desde antes que la célula se rompa con el sonicador.

Después de revelar el zimograma (Figura 7) es evidente que hay varios fragmentos de distinto tamaño molecular que presentan actividad amilolítica, lo cual nos hace suponer que la enzima sufrió algún tipo de daño (se dividió).

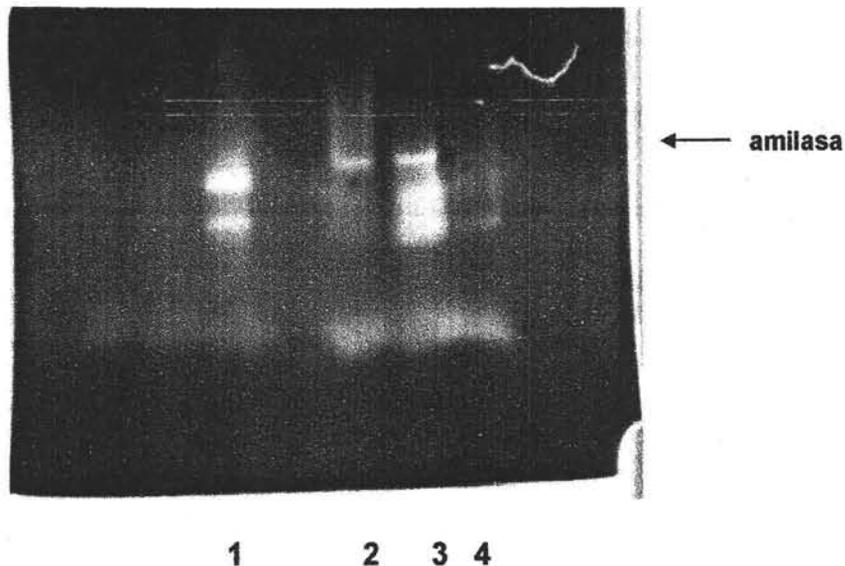


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, del proceso de liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio de sonicación. La actividad de la proteína se evaluó por el método de extinción del complejo almidón-yodo. La actividad de la proteína de interés se observó con lugol después de incubar el gel 1.5 h a 37 °C en almidón al 1 % y CaCl_2 50 mM. **Carril 1:** Tratamiento con TS y dializado durante 18 h vs. amortiguador de fosfatos/citratos **carril 2:** Tratamiento con lisozima y TS dializado 18 h, **carril 3:** Tratamiento con lisozima y TS sin dializar, **carril 4:** Sobrenadante final del ultrasonido completo.

Las células de *S. infantarius* 25124 utilizadas en este estudio se obtuvieron en un estudio previo (Flores, 2002). Era necesario conservar las células cosechadas y almacenarlas de alguna manera para poder utilizar la biomasa después, por lo que se conservaron en congelación a -20 °C. Muchos eventos pueden ocurrir durante la congelación. Primero el agua libre se congela y el cristal comienza a crecer. Los cristales de hielo son muy destructivos para la membrana celular y organelos, pero normalmente no afectan a las proteínas. A medida que la temperatura va decreciendo, el líquido remanente comienza a estar más concentrado en sales así como de proteínas, hasta que su solubilidad disminuye. Si las sales que componen a la disolución amortiguadora no son muy solubles se quedan atrapadas entre los cristales y el pH puede cambiar drásticamente antes que la solidificación se complete.

Si el almacenamiento es a temperatura entre -15 °C a -25 °C (utilizado), la disolución concentrada remanente puede tener un pH diferente a la disolución original. Las proteasas liberadas de los lisosomas durante la congelación pueden trabajar aún a estas bajas temperaturas y en pocas semanas de congelamiento pueden hacer mucho daño a las proteínas presentes (Scopes, 1994).

El proceso de almacenamiento (congelación a -20 °C) fue muy agresivo para la amilasa.

Etapas 2. Separación y purificación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 a partir de células recién cultivadas.

En vista del daño que se presentaba en la amilasa de células congeladas se realizaron fermentaciones en medio MRS-almidón con *S. infantarius* cepa 25124 con el fin de obtener células recién cultivadas.

Se realizaron tres procedimientos para liberar la enzima (urea, Tritón X-100 y sonicación) y una conclusión clara fue que el mejor método de liberación de la amilasa en células recién cultivadas fue el de sonicación (Tabla 6).

Comparando los métodos de liberación de la amilasa en células congeladas (Tabla 2) y en células recién cultivadas (Tabla 6) encontramos que el método de liberación la amilasa por medio de Tritón X-100 fue el menos eficiente, después siguió el método con urea y el más eficiente en ambos casos fue el de liberación por medio de sonicación.

Tabla 6. Actividad amilolítica de la enzima liberada de células cultivadas el mismo día y tratados con urea, Tritón X-100 y sonicación.

Método de liberación de la amilasa	Amilasa liberada Actividad (U/mL) ^a
Urea 8 M	3.63
Sonicación	16.34
Tritón X-100	1.02

a) el método de liberación respectivo se realizó el mismo día en que se cosecharon las células y la medición de la actividad amilolítica también.

Para realizar la purificación de la enzima se liberó la amilasa por sonicación por ser el método que libera más actividad en células recién cultivadas. Se prepararon 3 matraces con 250 mL de medio MRS-almidón cada uno y la biomasa resultante se sonicó. Se separó el sobrenadante del precipitado, y el precipitado se lavó 3 veces con agua destilada estéril, se determinó la actividad amilolítica del extracto después de cada uno de los pasos de sonicación (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad Amilolítica del proceso de liberación por sonicación de la enzima liberada en extracto celular recién cosechado.

Paso	Pasos del método de sonicación	Actividad amilolítica (U/mL)
1	Actividad de la enzima en células recién cosechadas.	11.62
2	Sobrenadante del extracto celular tratado con TS (Tris pH 8, sacarosa 25 %).	0
3	Sobrenadante del extracto celular tratado con lisozima y con TS (Tris pH 8, sacarosa 25 %) a 37 °C.	0
4	Sobrenadante después de la sonicación (amilasa liberada).	16.34
5	Precipitado después de la sonicación (amilasa asociada a la célula).	5.2

La actividad amilolítica en los distintos pasos de liberación de la enzima muestra que en el tratamiento con una disolución concentrada de sacarosa (Tabla 7; paso 2), no se libera actividad. Cuando además de la disolución hipertónica está presente la lisozima no se presenta tampoco actividad en el sobrenadante aún cuando la pared celular se degrada en presencia de la lisozima. Después de la sonicación (tratamiento muy fuerte) encontramos un valor de actividad liberada mayor al de todos los pasos de sonicación.

Los resultados anteriores indican que existen grandes diferencias entre la actividad del extracto celular cosechado 2 horas antes del tratamiento (Tabla 7) y el extracto almacenado a -20 °C (Tabla 5). Estas diferencias indican que las células recién cosechadas, al no haber sufrido algún tipo de daño anterior al de la extracción de la enzima, liberan la actividad al sobrenadante hasta que reciben un tratamiento vigoroso para liberarla (sonicación), y las células almacenadas en congelación, sólo necesitan ser expuestas a una disolución concentrada de sacarosa para romper la célula y liberar su contenido a la disolución utilizada. Es posible que las células ya estén rotas y que sólo con descongelarlas se libere su contenido.

La proteína de interés se observó al realizar SDS-PAGE y la actividad de la misma al realizar el zimograma con las muestras colectadas después de realizar los pasos de ruptura de las células por sonicación (Figuras 8 y 9).

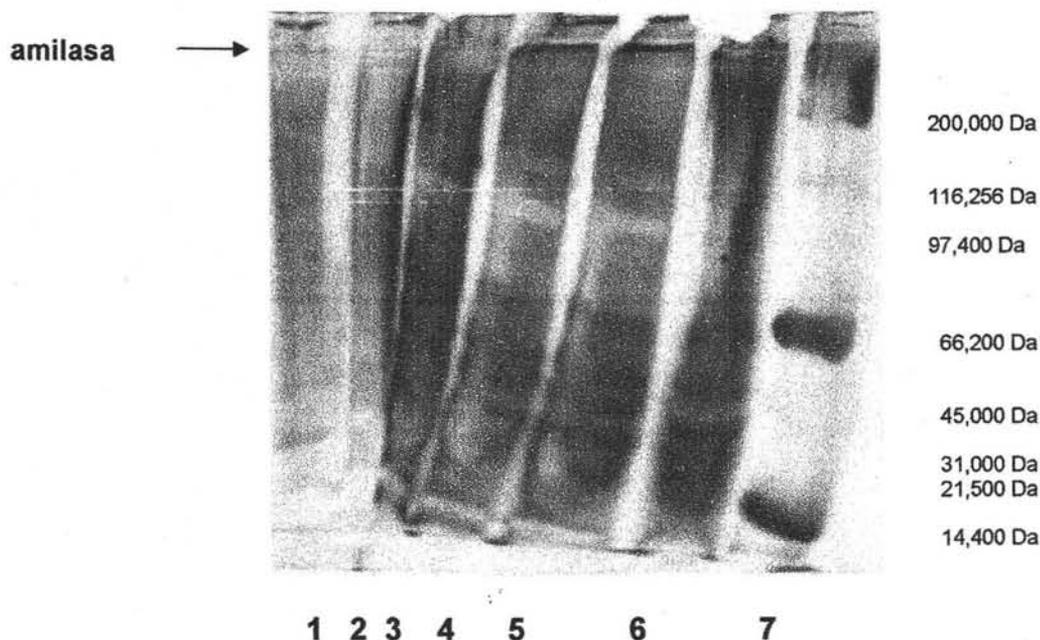


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T. Liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio de sonicación. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. Carril 1 y 2: Células después de cosecharlas y lavarlas con agua destilada estéril, carril 3: sobrenadante después de tratamiento con lisozima y TS, carril 4 y 5: sobrenadante resultante después de la sonicación, carril 6: precipitado después centrifugar la muestra resultante de la sonicación, carril 7: Marcador Molecular (Broad Range BioRad).

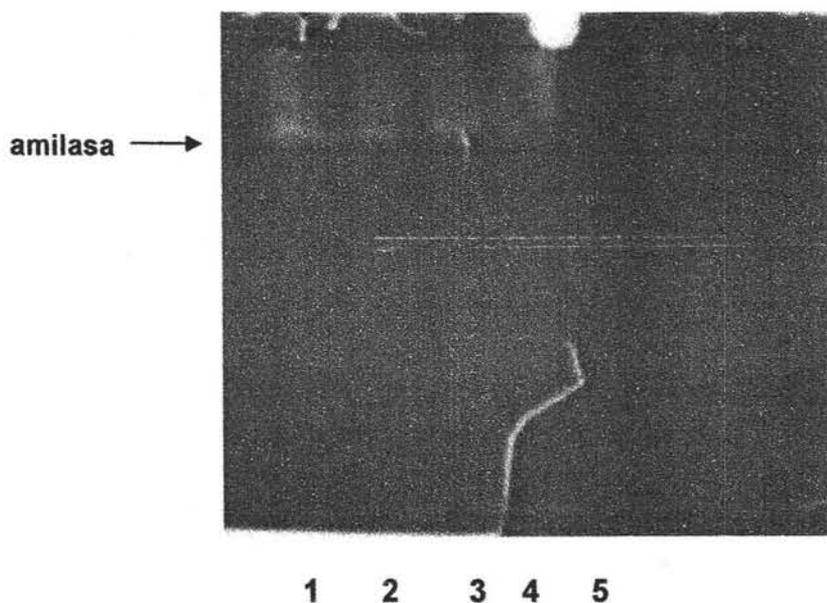


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T. Liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio de sonicación. La actividad de la proteína se evaluó por el método de extinción del complejo almidón-yodo. La tinción se realizó con lugol después de incubarse 2 h a 37 °C en almidón al 1 % y CaCl₂ 50 mM. Carril 1: precipitado después centrifugar la muestra resultante de la sonicación, carril 2 y 3: sobrenadante resultante después de la sonicación de los protoplastos, carril 4: protoplastos carril 5: células después de cosecharlas y lavarlas con agua destilada estéril.

En la Figura 8 no se observa ninguna proteína presente antes de que la célula fuera tratada para liberar la enzima por lo que la célula estaba íntegra y por lo tanto no hay proteínas fuera de ella, pero si muestra actividad (Tabla 7; paso 1), aunque está asociada a la célula y en el zimograma no se observa actividad amilolítica (Figura 9; carril 5). Cuando se utilizó la lizosima y quedaron solo los protoplastos se centrifugó la muestra y se separó el sobrenadante de éste (Figura 8; carril 3). Observamos más bandas que nos indican que algunas proteínas de membrana fueron liberadas, aunque no fue la amilasa esperada, ya que en la Tabla 7 (paso 2) no se obtuvo actividad amilolítica liberada.

El sobrenadante resultante después de la sonicación (Figura 8; carril 4 y 5) muestra mayor cantidad de proteínas presentes, y debe estar la amilasa presente aunque no se ve claramente en el gel teñido con plata. La Tabla 7 (paso 4) nos muestra un valor de actividad amilolítica liberada que corresponde a los carriles 2 y 3 del zimograma (Figura 9). En éste se ve la actividad amilolítica de la enzima en una sola banda la cual nos indica que nuestra enzima no ha sufrido daño, y su tamaño es semejante al reportado (200-250 kDa) previamente para la misma amilasa en extracto celular (Díaz, 2003).

Evaluación de la actividad de la amilasa de células recién cultivadas en almacenamiento a 4 °C.

El extracto celular antes de ser purificado estuvo en almacenamiento a 4 °C. Con el fin de evaluar la actividad y la integridad de la enzima durante el almacenamiento se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (Figuras 10 y 11).

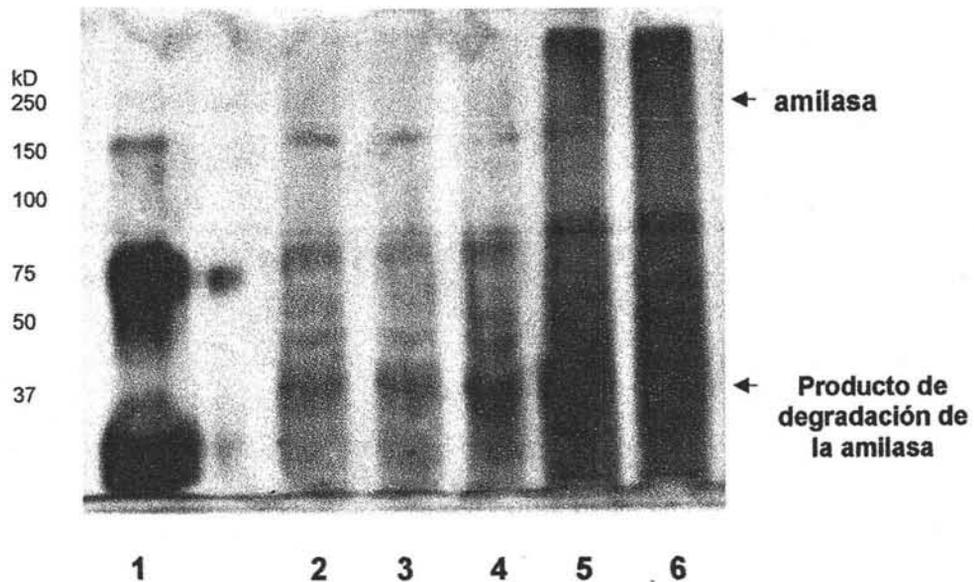


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de la amilasa de *S. infantarius* 25124 liberada por medio de sonicación después del almacenamiento a 6 °C. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. **Carril 1:** Marcador Molecular (Dual Color de BioRad), **carril 2:** tercer lavado del precipitado después de la sonicación, **carril 3:** segundo lavado del precipitado después de la sonicación, **carril 4:** primer lavado del precipitado después de la sonicación, **carril 5 y 6:** amilasa liberada de la sonicación de células recién cultivadas.

El perfil de proteínas de las células cultivadas y almacenadas (Figura 10) es muy parecido al que se obtuvo con las células antes de almacenarlas (Figura 8). En la Figura 8 no se observan de manera clara todas las proteínas presentes, sin embargo en la Figura 10 se encuentra una banda de 37 kDa en todos los carriles y no parece estar presente en el gel correspondiente a la Figura 8, esto nos indica que alguna de las proteínas se degradó. Con el zimograma obtenido (Figura 11), pudimos observar que la proteína que se degradó fue la amilasa.

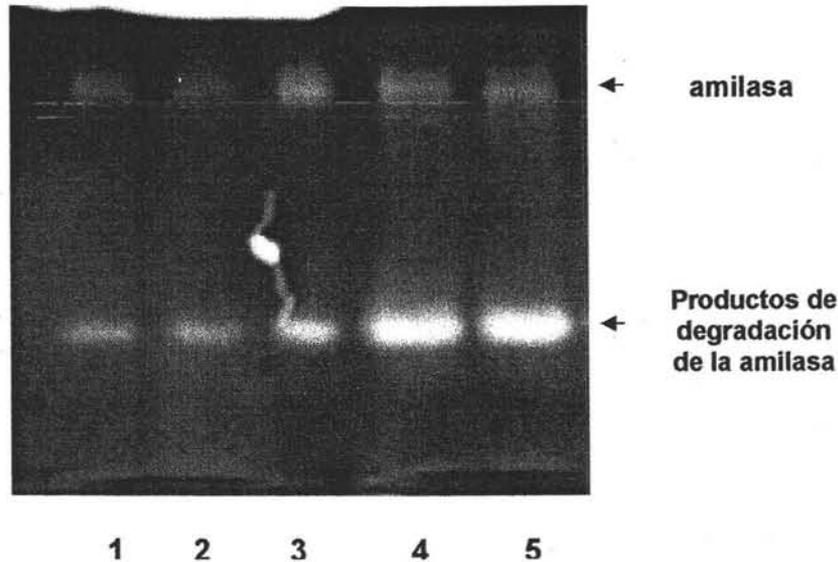


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6 % T, del sobrenadante de la liberación de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio de sonicación después de almacenar a 6 °C. La actividad de la proteína se evaluó por el método de extinción del complejo almidón-yodo. El zimograma se realizó con lugol después de incubarse 2 h a 37 °C en almidón al 1 % y CaCl_2 50 mM. Carril 1: tercer lavado del precipitado después de la sonicación, carril 2: segundo lavado del precipitado después de la sonicación, carril 3: primer lavado del precipitado después de la sonicación, carril 4 y 5: sobrenadante resultante de la sonicación de células recién cultivadas.

Se presenta actividad amilolítica en 2 fracciones (Figura 11) una de alto peso molecular (más de 200 kD) y otro de bajo peso molecular (aproximadamente 37 kDa), lo que nos indica que la enzima pudo haber perdido un sitio catalítico, ó que el peso molecular tan grande que presenta la amilasa es debido a que existe un agregado de amilasas más pequeñas que están unidas y por las condiciones en las que están se van disgregando. Después de haber hecho la sonicación de las células y haber separado el sobrenadante del precipitado, se lavó éste tres veces con agua destilada estéril por centrifugación (aguas de lavado). Las aguas de lavado tenían actividad presente, por lo que el agua recolectada durante los tres lavados se juntó con el sobrenadante obtenido después de

haber sonicado las células (esta fue la muestra que se purificó 90 mL). A esta muestra se le midió actividad y cantidad de proteína presente a 280 nm.

Purificación de la amilasa de extractos celulares obtenidos con sonicación.

a) Características de la muestra

La concentración de proteína medida a 280 nm en el espectrofotómetro UV/Vis antes de la purificación fue de: 5.016 mg/mL.

La actividad amilolítica medida en la muestra a purificar fue de: 6.59 U/mL

Se purificaron 90 mL de muestra.

b) Separación de la proteína de interés

Para purificar la amilasa se utilizó cromatografía de afinidad, por medio de un equipo de Cromatografía Líquida de alta Resolución (FPLC ÄKTAprime 01117322).

La columna utilizada (Pharmacia) contenía un gel de sefarosa 6- β -epoxiactivada (Pharmacia) acoplado a β -ciclodextrina (Sigma).

El flujo con el que se pasó la muestra fue de: 0.5mL/min a 0.18 μ Pa.

La elución se realizó con una disolución de β -ciclodextrina 8 mM.

El espectro de purificación se observa en la Figura 12.

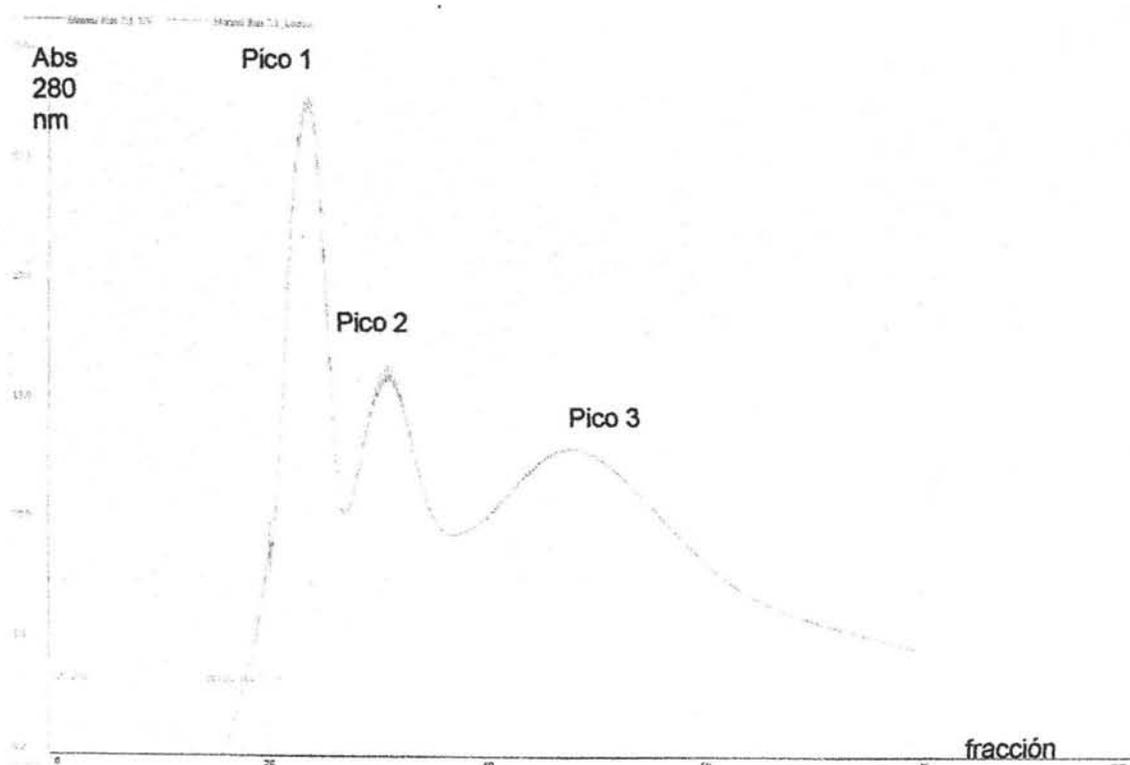


Figura 12. Espectro de purificación obtenido de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio del equipo de FPLC ÄKTAprime 01117322, en una columna con gel de sefarosa 6- β -epoxiactivada (Pharmacia) acoplado a β -ciclodextrina (Sigma).

Observamos 3 picos distintos en el espectro por lo que se midió la cantidad de proteína presente en cada una de las 65 fracciones de 1 mL que fueron recolectadas (Tabla 8).

En el pico donde se obtuvo más cantidad de proteína fue en el pico 2, y después el pico donde hubo mayor contenido de proteína fue el pico 1. Una vez medida la cantidad de proteína presente se escogieron las fracciones que tenían mayor cantidad de proteína y se les determinó actividad amilolítica.

A pesar de que la mayor concentración de proteína se encontró en el pico 2, no fue ahí donde se encontró la mayor actividad amilolítica. La absorbancia registrada puede deberse a compuestos presentes que absorban a 280 nm ó por otras proteínas que hayan quedado después de la purificación.

Tabla 8. Actividad amilolítica y concentración de proteína presente después del proceso de purificación de la amilasa de *S. infantarius* 25124.

Pico	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad amilolítica U/mL
1	2.370	1.106
1	0.164	0.4212
1	0.120	0.2581
2	2.279	0.3524
2	2.877	0.3528
3	0.095	—

Con el fin de evaluar la actividad y la integridad de la enzima purificada durante el almacenamiento se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), (Figura 13 y 14).

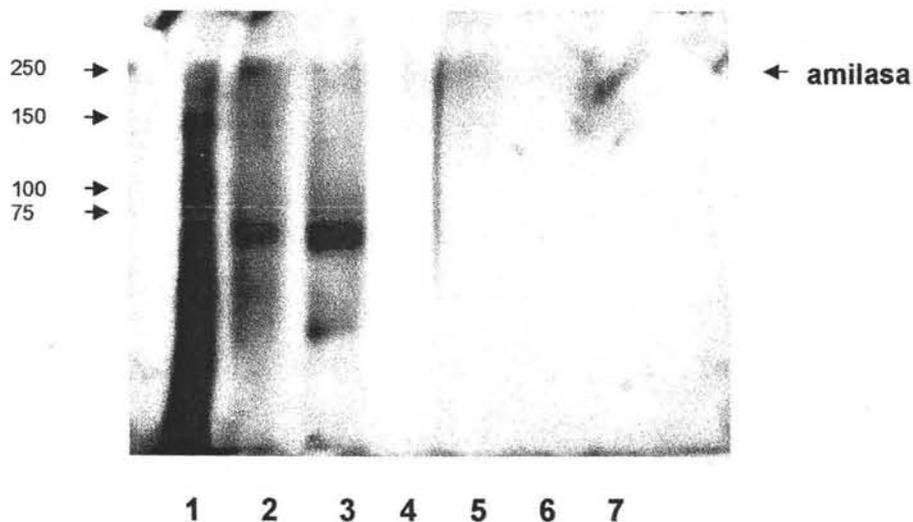


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. **Carril 1:** Marcador Molecular (BioRad) Dual Color, **carril 2 y 3:** fracción correspondiente al pico 1 del espectro después de la purificación, **carril 4 y 5** fracción correspondiente al pico 2 del espectro después de la purificación, **carril 6 y 7:** fracción correspondiente al pico 3 del espectro después de la purificación.

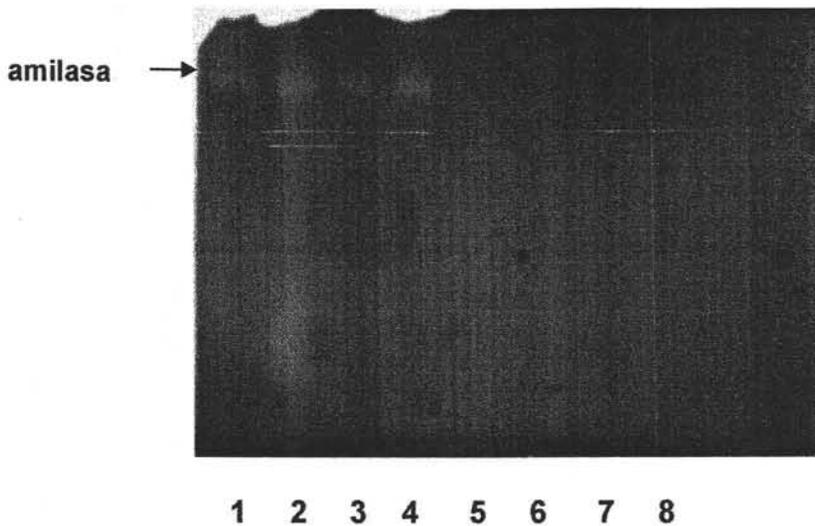


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones obtenidas en la purificación de la enzima de *S. infantarius* 25124. La actividad de la proteína se evaluó por el método de extinción del complejo almidón-yodo. El zimograma se realizó con lugol después de incubarse 2 h a 37 °C en almidón al 1 % y CaCl_2 50 mM. **Carril 1, 3 y 4:** fracción correspondiente al pico 1 del espectro después de la purificación, **carril 2:** muestra antes de ser purificada, **carril 5 y 6:** fracción correspondiente al pico 2 del espectro después de la purificación, **carril 7 y 8:** fracción correspondiente al pico 3 del espectro después de la purificación.

Se observa que aunque la lectura de proteína más alta fue la correspondiente a la del pico 2, no se obtuvo ninguna proteína teñida en el gel (Figura 13; carril 4 y 5) y la actividad reportada según la Tabla 8, no fue la más alta, aunque si hay un poco de actividad, que no es apreciable en el zimograma (Figura 14, carril 5 y 6).

En la Figura 13 se observa que después del proceso de purificación hay 3 proteínas presentes aparte de la proteína de interés, dos proteínas con un peso un poco menor a 75 kDa, y otra a 37 kDa lo cual nos indica que la enzima puede estar degradándose y las partes en las que se divide no tienen actividad ó que la matriz de sefaroza tiene afinidad a alguna otra proteína y son las que están presentes en los carriles 1 y 2 de la Figura 13. Por otro lado la Figura 14 (Carril 3 y 4) nos muestra que la amilasa aunque en muy poca cantidad, si conserva su actividad después de la purificación y además su peso molecular de 250 kDa, que es igual al que se tiene en extractos celulares antes de

que se purifique la enzima (Figura 14; carril 3 y 4). Por lo que la enzima pura tiene un peso molecular igual al reportado por Díaz (2003) en extractos celulares.

Métodos de concentración de la amilasa.

Por otro lado, la actividad amilolítica presente en las muestras purificadas fue muy baja por lo que fue necesario concentrar la enzima por medio de tres diferentes métodos detallados en la Metodología (Etapa 2.9): microfiltración (Microcon, Etapa 2.9.a), Evaporación de agua por alta velocidad (SpeedVac Etapa 2.9.b), y liofilización (Etapa 2.9.c).

Con el fin de evaluar la eficiencia de los métodos de concentración propuestos para la enzima, se midió la cantidad de proteína presente y la actividad amilolítica de la misma antes y después de concentrarla (Tabla 9).

Tabla 9. Eficiencia del método de concentración de la amilasa purificada de *S. infantarius* 25124.

Método de concentración de la enzima	Actividad amilolítica^a U/mL	Conc. de proteína^a mg/mL	Actividad amilolítica^b U/mL	Conc. de proteína^b mg/mL
Microcon	0.62	0.217	0.7	3.265
SpeedVac	0.3396	2.575	0.612	5.600
Liofilización con diálisis previa	0.4212	0.164	—	5.170
Liofilización sin diálisis	1.106	2.235	—	8.960

^a antes de hacer la concentración de la enzima

^b después del proceso de concentración

— no hay actividad medible

Con estos métodos se logró concentrar la proteína casi al doble de la concentración inicial (Tabla 9). La actividad amilolítica por otro lado no aumentó de manera

considerable, e incluso se perdió después de concentrar por medio de liofilización. De acuerdo con estos resultados (Tabla 9), el mejor método para concentrar la célula es por medio del equipo SpeedVac. Sin embargo la cantidad de proteína concentrada no fue suficiente para realizar la caracterización de la proteína.

Con el fin de evaluar la actividad y la integridad de la enzima durante el almacenamiento y después de los métodos de concentración de la enzima, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (Figura 15 y 16). Las muestras de proteína se conservaron a 4 °C durante el proceso de concentración realizado (3 semanas).

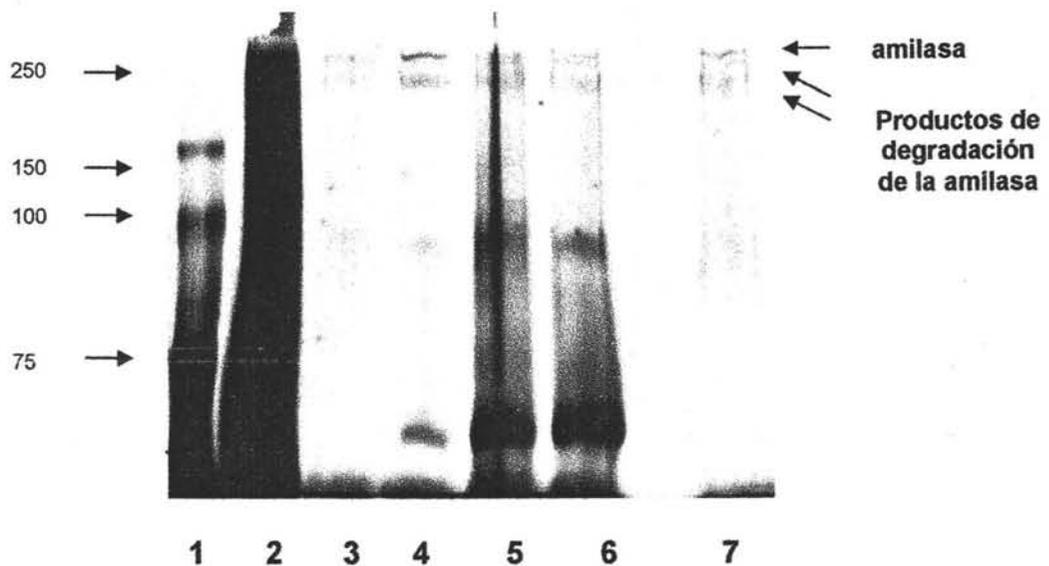


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones de purificación obtenidas durante este proceso. La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. **Carril 1:** Marcador Molecular (BioRad) Dual Color, **carril 2:** muestra antes de ser purificada, **carril 3:** enzima después de haber sido purificada, **carril 4:** concentración de enzima utilizando el SpeedVac, **carril 5 y 6:** concentración de enzima por medio de liofilización **carril 7:** concentración de proteína por medio de microcon.

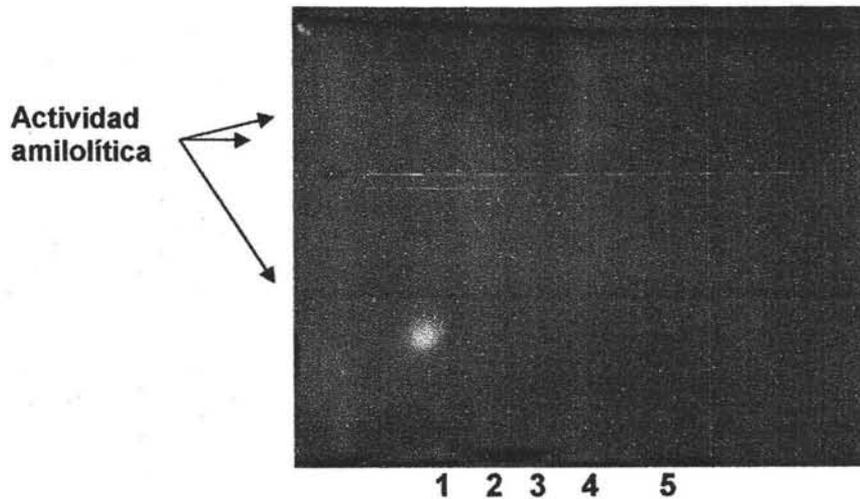


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7.5 % T, de las fracciones de purificación obtenidas en la purificación de la enzima de *S. infantarius* 25124. La actividad de la proteína se evaluó por el método de extinción del complejo almidón-yodo. El zimograma se realizó con lugol después de incubarse 2 h a 37 °C en almidón al 1% y CaCl₂ 50 mM. **Carril 1:** muestra antes de purificar, **carril 2:** enzima después de haber sido purificada, **carril 3:** concentración de enzima por medio de liofilización, **carril 4:** concentración de enzima utilizando el SpeedVac, **carril 5:** concentración de proteína por medio de microcon.

En la Figura 15 se observa que la amilasa sigue estando en la posición cercana a los 250 kD en los carriles 3, 4, 5, 6 y 7 (correspondientes a los métodos de concentración de la amilasa), sin embargo en todos los carriles se encuentran 2 bandas muy cercanas a la de mayor peso molecular (Figura 15) que antes de la purificación no estaban, (Figura 10), esto aunado a que en el zimograma (Figura 16) no se observa actividad amilolítica en el tamaño correspondiente a 250 kDa. La muestra concentrada con el equipo SpeedVac es el que mostró actividad en el zimograma (Figura 16; carril 4), sin embargo la actividad presente corresponde a una proteína menor a los 250 kDa.

El método de liofilización de la enzima fue agresivo, ya que la enzima perdió toda su actividad durante este proceso. Generalmente el secado completo de las proteínas puede tener un efecto de inactivación, y a pesar de que la liofilización es un tratamiento en frío, se puede perder actividad al liofilizar (Scopes, 1994).

El tamaño molecular de la enzima pura fue un poco mayor a los 250 kD, y hasta la fecha es la enzima más grande que se ha encontrado.

Es muy compleja la manipulación de la enzima, el almacenamiento es uno de los mayores problemas, porque se comienza a fragmentar la enzima aún cuando se encuentre en una disolución con azúcares que le permitirían estar estable a bajas temperaturas.

VIII. CONCLUSIONES

- La amilasa presente en células congeladas de *S. infantarius* 25124 se degrada con facilidad. El gran tamaño de la enzima y las condiciones de almacenamiento afectaron su integridad y actividad.
- Para extraer la amilasa activa asociada a la célula de *S. infantarius* 25124 se requieren células recién cultivadas.
- El mejor método para liberar la enzima asociada a la célula en extractos celulares recién cultivados es por sonicación.
- La extracción de la amilasa se debe realizar como máximo 12 horas antes de que se purifique para, evitar su degradación.
- La actividad amilolítica de la enzima liberada por sonicación disminuye durante del proceso de purificación.
- La purificación realizada por medio de sefarosa 6- β epoxiactivada se da con baja eficiencia, debido a que no se obtiene una cantidad suficiente de proteína y se pierde la actividad de la enzima.
- Después del proceso de purificación se requiere concentrar la amilasa para continuar con la caracterización de la misma.
- El proceso de concentración de la enzima por medio de liofilización daña a la amilasa. El mejor método de concentración de la enzima fue por medio de la evaporación de agua a alta velocidad.
- El peso molecular estimado de la amilasa pura de *S. infantarius* 25124 es de aproximadamente 250 kDa, y coincide con el reportado previamente de los extractos celulares (Díaz, 2003).

- La amilasa de *S. infantarius* 25124 es la amilasa de mayor peso molecular que hasta el momento se haya reportado en la literatura.

IX. PERSPECTIVAS

- Se deben mejorar las condiciones de purificación para obtener más cantidad de enzima activa y obtener mejores rendimientos.
- Se deben mejorar las condiciones de almacenamiento de la amilasa para evitar que se degrade tan fácilmente.
- Con suficiente concentración de enzima se puede caracterizar la amilasa para conocer su comportamiento una vez pura.
- Para poder verificar el peso molecular de la amilasa es necesario obtener la secuencia de aminoácidos de la enzima.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar G. Morlon-Guyot J. Trejo-Aguilar B. y Guyot J. 2000. "Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium", ***Enzyme and Microbial Technology***. 27:406-413.
2. Ampe F. Ben Omar N. Moizan C. Wachter C. y Guyot J. 1999. "Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations", ***Applied and Environmental Microbiology***. 65:5464-5473.
3. Ben Omar N. y Ampe F. 2000. "Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol", ***Applied and Environmental Microbiology***. 66:3664-3673.
4. Bolaños N.S. "Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante DGGE. Tesis de maestría, UNAM, México, D.F., 2003.
5. Boyer C.D. and Shanon J.C. ***Corn: chemistry and technology*** (Watson and P.E. Ramstad: St Paul Minn., 1987). 253-227, American Association of Cereal Chemists.
6. Cañas Urbina A.O. Bárzana G. Owens J.D. y Wachter R. 1993. La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. ***Ciencia***. 44. 219-229.
7. Castillo P. Suárez G. Gasparin S. y Morlon-Guyot J. 1993. "Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*". ***Applied Microbiological Biotechnology***. 40:266-269.

8. Díaz-Ruíz G. Guyot J.P. Ruíz-Terán F. Morlon Guyot 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 fermented maize beverage". *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 367-4374.
9. Díaz Ruíz G. "Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol", Tesis de doctorado, UNAM, México, D.F. 2003.
10. Eiichi S. Tai U. Toshiaki K. y Kazuo K. 1997. "Purification, characterization, and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing α -amylase from *Streptococcus bovis* 148". *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4941-4944.
11. Escalante A. Wachter C. y Farrés A. 2001. "Lactic acid bacteria in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rRNA sequence analysis", *International Journal of Food Microbiology*. 64: 21-31.
12. Fenemma O.R., *Química de los alimentos*, Acribia S.A. Zaragoza, España. 1993. 237-247.
13. Flores E. 2002. "Variables operativas para el crecimiento de *Streptococcus bovis* en un fermentador de 5L", Seminario de Ingeniería de Proyectos.
14. Fogarty W. y Kelly C. *In progress in industrial Microbiology*, A.M. Bull Elsevier Publishing Company Vol. 15, Amsterdam, 1979. 87-151.
15. Freer S. 1993. "Purification and characterization of the extracellular amylase from *S. bovis* JB1". *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1398-1402.

16. Giraud E. Gosselin L. Marin B. Parada J. y Rimbault M. 1993. "Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6". **Journal of Applied Bacteriology**. 75:276-282.
17. Gupta R. Paresh G. Mohapatra H. Kummar V. y Chauhan B. 2003. "Microbial α -amylases: a biotechnological perspective". **Process Biochemistry**. 38:1599-1616.
18. Hardie J. y Whiley R. 1997. "Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*". **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. 83:1S-11S.
19. Hernández C. Aplicaciones en la cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) para la separación de biomoléculas. Trabajo monográfico de actualización de licenciatura, UNAM, México D.F. 1987.
20. Lacks S. y Springhorn S. 1980. "Renaturation of enzyme after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate". **Journal of Biology and Chemistry**. 255:7467-7473.
21. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-685.
22. Lindgren S. y Refai O. 1984. "Amylolytic acid bacteria in fish silage", **Journal of Applied Bacteriology**. 57:221-228.
23. Nelson D. y M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. ed 3°. Ed. Cox Worth Publication, New York, 2002.
24. Nielsen J. y Borchert T. 2000. "Protein engineering of bacterial α -amylases", **Biochemica et Biophysica Acta**, 1543: 253-274.

25. Nuraida L. Wachter C. y Owens J. 1995. "Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough", **World Journal Microbiology Biotechnology**. 11: 567-571.
26. Olivares I. Wachter. C. Le Borgne S. y López-Munguía A. 2002. "Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source. A *Leuconostoc citreum* strain isolated from *Pozol*, a fermented corn beverage of Mayan origin", **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28:112-117.
27. Pandey A. Nigam P. Soccol C. Soccol V. Singh D. y Mohan R. 2000. "Review. Advances in microbial amylases", **Biotechnology Applied Biochemistry**. 31: 135-152.
28. Poyart C. Quesne G. y Trieu-Cout P. 2002. "Taxonomic dissection of the *S. bovis* group by analysis of manganese dependent superoxide dismutase gen (Sod A) sequences: reclassification of *S. infantarius* sub. *coli* as *S. luletiensis* sp. nov. and *S. bovis* biotype II. *S. pasteurianus* sp. nov." **International Journal of Systematic Evolution of Microbiology**. 52:1247-1255.
29. Romo A. **Química, Universo, Tierra y Vida**, Ed. Fondo de Cultura Económica, México, 1998, cap. 4.
30. Rooney W. y Almeida-Domínguez. "Productos de maíz nixtamalizado y calidad del maíz". Seminario sobre tecnología de la Tortilla, 1995.
31. Sainz T. Wachter C. Espinoza J. Centurión D. Navarro A. Molina J. Inzuza I. Braviota A. y Eslava C. 2001. "Survival and characterization of *Escherichia coli*, strains in a typical Mexican acid fermented food". **International Journal of Food Microbiology**. 71:169-176.

32. Santillana G. "Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para análisis químico de nixtamal y pozol". Tesis de maestría en Ciencias Químicas, UNAM, México.D.F, 1995.
33. Schlegel L. Grimont F. Colins M. Régnault B. Grimont P. y Bouvet A. 2000. "*Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 20:1425-1434.
34. Scopes K. *Protein Purification Principle and Practice*, ed. 3, Ed. Springer, New York, 1994.
35. Sen S. y Chakrabarty A. 1986. "Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolates from vegetable wastes: Purification and characterization". *Journal of applied Bacteriology*. 62:419-423.
36. Serna S. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*, AGT Editor, México S.A., 2001, 207-213, 415-422.
37. Shelby N. 1993. "Purification and characterization of the extracellular α -Amylase from *Streptococcus bovis* JB1", *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1398-1402.
38. Simpson C. Russel R. 1998. "Intracellular α -Amylase of *Streptococcus mutans*", *Journal of Bacteriology*. 180:4711-4717.
39. Trejo-González A. 1982. "The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation", *Advances in Chemical series Modification of proteins. American Chemical Society*. 198: 245,263.

40. Ulloa M. 1974. Mycofloral succession in *pozol* from Tabasco, Mexico. ***Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología***. 8, 17-48
41. Ulloa M. Herrera T. y Taboada J. 1983. Pozol, a fermented maize dough consumed in southern Mexico, In Handbook of Indigenous Fermented Foods, Steinkraus, K.H., Cullen, R.C. Pederson C.S. Nellis, L.F. y Gravitt, B. pp. 226-233, New York; Marcel Dekker.
42. Ulloa M. Herrera T. y Lappe P. 1987. "Fermentaciones tradicionales indígenas de México", ***Serie de Investigaciones Sociales*** 16: 13-20, México, Instituto Nacional Indigenista.
43. Upssala, **Protein purification. Handbook**. Amersham Pharmacia Biotech. 1998. Sweden 5-40, 85-88.
44. Van der Maarel M. Van der Veen B. Uitdehaag Joost C. Leemhuis H. y Dijkhuizen L. 2002. "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family". ***Journal of Biotechnology***. 94: 137-155.
45. Wachter C. Cañas A. Cook P. Bárzana E. Owens J. 1993. "Sources of microorganisms in *pozol*, a traditional Mexican fermented maize dough". ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***. 9: 269-274.
46. Wachter M. Cañas A. Bárzana E. Lappe P. Ulloa M. y Owens D. 2000. "Microbiology of Indian and Mestizo *pozol* fermentations". ***Food Microbiology***. 17: 251-256.
47. Wood B. y Holzappel. ***The genera of lactic acid bacteria***, (Karlsruhe: Blackie academic & professional, 1995) pp. 55-115.

AI. ANEXO I

Preparación de medios de cultivo y disoluciones

AI.I. Medios de cultivo

Medio MRS-almidón (1 L)

Sustancias	Cantidad (g) (Para preparar 1 L)
Peptona pancreática de caseína (Oxoid L42).	10
Extracto de carne (Oxoid L29).	10
Extracto de levadura (Oxoid L21).	5
Hidrocitrato de amonio (Mallinckrodt 0644-03).	2.17
Acetato de sodio anhidro (J.T. Baker 3460-01).	5
Sulfato de magnesio heptahidratado (Sigma M9397).	0.207
Sulfato de manganeso monohidratado (Sigma M6528).	0.056
Fosfato de dipotasio hidrogenado (Mallinckrodt 7088).	2.62
Almidón (MerckEurolab PROLABO 21 152.291).	20
Agar bacteriológico (Oxoid L11).	15

Nota: Agregar agar bacteriológico si es medio sólido, si es medio líquido no se agrega.

AI.II. Disoluciones

Acrilamida/bis (30 % T, 2.67 % C)

Acrlamida (Sigma A3553).

N`N`bis-metilen-acrilamida (Sigma M-7279).

14.6 g acrilamida en 50mL.

0.4 g N`N`bis-metilen-acrilamida 50 mL.

Aforar a 50 mL con agua desionizada. Filtrar, desgasificar y almacenar a 5 °C en oscuridad.

Nota: cubrir el frasco con papel aluminio sólo se puede utilizar durante los 30 primeros días después de su preparación.

Almidón (disolución) PROLABO 7 g/L para ensayo de actividad (25 mL).

Almidón (MerckEurolab PROLABO 21 152.291).

Disolver 0.175 g de almidón en 25 mL de agua destilada.

Nota: Preparación el mismo día en el que se utiliza, disolver calentando. Utilizar hasta que se enfríe a temperatura ambiente.

APS (Persulfato de amonio) 10 % p/v, 1 mL.

Persulfato de amonio (Sigma A9164).

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada.

Nota: Preparar el mismo día en que se utilice.

Cloruro de Calcio 100 mM (10 mL).

Cloruro de calcio dihidratado (Sigma C-3881).

PM. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 147 g/mol.

Disolver 0.147 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.

Cloruro de Sodio 100 mM (25 mL).

Cloruro de Sodio (J.T.Baker 3624-01).

PM NaCl 58.4 g/mol.

Disolver 0.146 g de NaCl en un poco de agua destilada y aforar a 25 mL.

Disolución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 4 (100 mL).

Ácido acético (J.T.Baker 9507-05).

Acetato de sodio (J.T.Baker 3460-01).

Disoluciones Patrón

A: Disolución de ácido acético 0.2M (11.55 mL en 1000 mL de agua destilada).

B: Disolución de acetato de sodio 0.2 M (16.4 g de $C_2H_3O_2Na$ o 27.2 g de $C_2H_3O_2Na_3 \cdot H_2O$ en 1000 mL de agua destilada).

41 mL de disolución A + 9 mL de disolución B, aforados a 100 mL.

Disolución amortiguadora de boratos pH 8 (100 mL).

Ácido bórico (J.T. Baker 008420).

Borato de sodio (J.T.Baker 3574-01).

Disoluciones Patrón.

A: disolución de ácido bórico 0.2 M (12.4 g en 1000 mL).

B: disolución de bórax 0.05 M (19.05 g en 1000 mL; 0.2 M en términos de borato de sodio).

50 mL de disolución A + 4.9 mL de disolución B, diluido en un total de 200 mL.

Disolución amortiguadora fosfatos citratos 0.1 M pH 6.6 (100 mL).

Ácido cítrico (J.T.Baker 0110-01).

Fosfato dibásico de sodio (J.T. Baker 3824-01).

Disoluciones Patrón

A: disolución de ácido cítrico 0.1 M (19.21 g/1000 mL).

B: disolución de fosfato dibásico de sodio 7 hidratado 0.2 M (53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o 71.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL de agua destilada).

13.6 mL de disolución A + 36.4 mL de disolución B, diluido en un total de 100 mL.

Disolución amortiguadora Tris (hidroximetil aminometano) pH 8 (200 mL).

Tris (Sigma T1503).

HCl (J.T.Baker 4764-01).

Disoluciones Patrón

A: disolución 0.2 M de Tris (24.2g en 1000 de agua destilada).

B: ácido clorhídrico 0.2 M.

50 mL de A + 26.8 mL de B, aforados a 200 mL.

Disolución KI/I₂ concentrado (500 mL).

KI (J.T.Baker 3162-01): 15 g.

I₂ (J.T.Baker 2208): 1.5 g

Aforar a 500 mL.

Nota: Guardar en frasco ámbar cubierto con aluminio siempre en refrigeración.

Disolución KI/I₂ 4% (100 mL).

Disolver 4 mL de la disolución anterior y aforar a 100 mL.

Nota: La disolución yodo-yoduro al 4 % (v/v) se realiza en el momento en el que se va a medir la actividad enzimática, mantener siempre en hielo.

EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 100 mM (100 mL).

EDTA (J.T.Baker 8993-01).

PM 372.2 g/mol $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$.

3.72 g de EDTA para 100 mL

Nota. Conservar en refrigeración.

Glicerol (congelación de células a -70 °C).

Glicerol (J.T.Baker 2136-02).

Preparar el glicerol al 80 % con agua destilada. Guardar en tubos con tapón de rosca de 1.5 mL (0.75 mL en cada tubo), y esterilizar.

Hidróxido de sodio 10 M (25 ml).

Hidróxido de sodio (Mallinckrodt 7708-03).

PM NaOH 40 g/mol

Disolver con agitación magnética 10 g de NaOH en 25 mL de agua destilada.

Nota: Tener cuidado reacción exotérmica.

H₂SO₄ 2 N (100 mL).

H₂SO₄ (J.T.Baker 9681-05).

5.6 mL H₂S O₄ al 96% aforado a 100 mL

Nota: Guardar en refrigeración.

SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 10%.

SDS (Sigma L4390).

Disolver 10 g de SDS en agua con agitación leve y aforar a 100 mL.

Nota: Almacenar a temperatura ambiente.

Tris HCl 50 mM; pH 8; Sacarosa 25% (100 mL).

Tris (Sigma T15-03).

HCl (J.T.Baker 4764-01).

Sacarosa (Sigma S93-78).

Tris (Hidroximetil aminometano) PM 121.1 g/mol

Disolver 0.6055 g de Tris en una parte del agua destilada, una vez disuelto, agregar 25 g de sacarosa y disolver completamente con el agua destilada restante.

Ajustar pH a 8 con HCl.

Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (300 mL).

54.49g de Tris base en 300 mL de agua destilada.

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N. Aforar 300 mL con agua.

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (200 mL).

12.1 g de Tris base para 200 mL de agua destilada

Ajustar a pH 6.8 con HCl 1N. Aforar 200 mL con agua destilada.

Tritón X-100 (t-octilfenoxipolitoxiatanol) 0.1 % (25 mL)

Tritón X-100 (Sigma X-100).

Disolver 2.5 mL de Tritón X-100 en 25 mL de agua destilada.

Urea 8 M $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (25 mL).

Urea (Sigma U-6504).

PM 60.06 g/mol

Disolver 12.01 g de urea en agua destilada con agitación continua y calentamiento leve hasta disolver, aforar a 25 mL.

AII. ANEXO II

Tratamiento de la membrana de diálisis

La membrana (SpectroPor 7 PM 50,000) está inmersa en una disolución de cloruro de azida que inhibe el crecimiento de microorganismos y mantiene húmeda a la membrana. Además del cloruro de azida la membrana puede contener otros químicos utilizados durante la fabricación de la misma. Con la finalidad de remover los químicos presentes en la membrana y evitar que causen daño a la muestra que va a ser dializada, se realizó el siguiente tratamiento previo a la utilización de la membrana de diálisis.

Con guantes limpios y tijeras se corta la cantidad de membrana que se vaya a utilizar, ésta se lava 3 veces en 200 mL de agua destilada cada vez. Se pone un broche (SpectraPor Closures) en uno de los extremos de la membrana con el fin de evitar que se salga la muestra. Con ayuda de un embudo estéril se coloca la muestra de interés. Se quitan las burbujas en caso de que haya y se coloca un segundo broche atado a un pedazo de cordón en el otro extremo de la membrana. Se coloca la bolsa de diálisis llena con la muestra en el recipiente que contiene la sustancia contra la cual se va a dializar y se deja en refrigeración con agitación continua.

AIII. ANEXO III

**Composición y Preparación de Geles de acrilamida/bis en condiciones
desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

Disolución amortiguadora de carga

Composición	Cantidad
Agua destilada	4 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1 mL
Glicerol (J.T.Baker 2136-02)	800 μ L
SDS (Sigma L4390) 10%(w/v)	1.6 mL SDS-PAGE
2- β -mercaptoetanol (Sigma M-7154)	400 μ L
Azul de bromofenol (Sigma 958) 0.05 % (w/v)	200 μ L
Total	8 mL

Para gel de actividad: 15 μ L de muestra +10 μ L de disolución amortiguadora de carga.

Para gel de tinción de proteínas: 10 μ L de muestra +15 μ L de disolución amortiguadora de carga (preparar 5 minutos antes de cargar).

Después de poner el buffer de carga poner las muestras en ebullición a baño María, y dejar en ebullición 5 minutos, inmediatamente después pasarlo a hielo y cargar.

Disolución amortiguadora de Migración en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Composición	Cantidad
Tris-base 125 mM	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	0.5 g/L /SDS-PAGE

Se debe diluir 1:5 para obtener la disolución amortiguadora a 25 mM, 200 mL de disolución amortiguadora 5x+800 mL de agua destilada para una migración.

Condición de migración con fuente de poder Power Pac 300: 90V 1 hora 45 minutos.

Electroforesis sobre gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Composición	Gel de separación 6 %	Gel de separación 7.5 %	Gel de concentración 4 %
Acilamida/bis 40 %	3 mL	3.8 mL	1 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	—	-----	2.5 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	5 mL	5 mL	-----
SDS 10 %	200 µL	200 µL	100 µL
Agua desionizada	11.7 mL	10.9 mL	6.4 mL
Temed	10 µL	10 µL	10 µL
Persulfato de amonio 10 % (p/v)	100 µL	100 µL	50 µL
Total	20 mL	20 mL	10 mL

Desgasificar por 15 minutos antes de la polimerización.

Persulfato de amonio: 0.1 g o 100 mg/mL de agua desionizada.

20 mL de disolución de acilamida/bisacilamida alcanza para 8 minigeles con un espesor de 0.7 mm.

Zimograma

1. Lavar el gel con agua destilada 10 minutos.
2. Lavar el gel con buffer de fosfatos citratos pH 6.6, 0.1 M, 10 minutos
3. Lavar el gel con agua destilada 10 minutos.
4. Lavar el gel con buffer de fosfatos citratos pH 6.6, 0.1 M, 10 minutos.

5. Preparar disolución: 1g almidón en 100 mL de buffer de fosfatos/citratos 0.1M pH 6.6 con CaCl_2 50 mM.
6. Incubar durante 3 horas en la disolución de almidón anterior a 37 °C.
7. Terminado el tiempo de incubación lavar con agua destilada durante 10 minutos.
8. Preparar 100 mL de una disolución de yodo-yoduro al 4 %, retirar el agua destilada.
9. Revelar con lugol hasta que aparezcan las líneas correspondientes a la hidrólisis de almidón.

Tinción de Plata.

La tinción con plata se realizó según lo recomendado por el proveedor. Para la tinción se utilizó el Kit Silver Stain Plus 161-0449 de BIORAD.

Marcador Molecular utilizado

Precision Plus Protein™ Standards
Dual color
Catalog # 161-0374
BIO-RAD
(Purificación de enzima)



AIV. ANEXO IV

Curva Patrón de la prueba de actividad amilolítica

$$\text{Actividad amilolítica (U/mL)} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) \times 1/P \times 3 \quad (1)$$

P = pendiente de la curva patrón de almidón (absorbancia a 620nm vs. Concentración de almidón en g/L) (Díaz, 2003).

Tabla 10. Curva patrón de almidón utilizada para determinar la actividad amilolítica de *S. infantarius* 25124 por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo.

Tubo	mL stock (almidón PROLABO 7g/L).	mL agua dest	conc almidón (g/L)	Abs 620nm promedio
blanco	0.0	1.0	0	0
1	0.2	0.8	1.4	0.177
2	0.4	0.6	2.8	0.3435
3	0.6	0.4	4.2	0.4845
4	0.8	0.2	5.6	0.636
5	1.0	0.0	7.0	0.781

Blanco: agua destilada

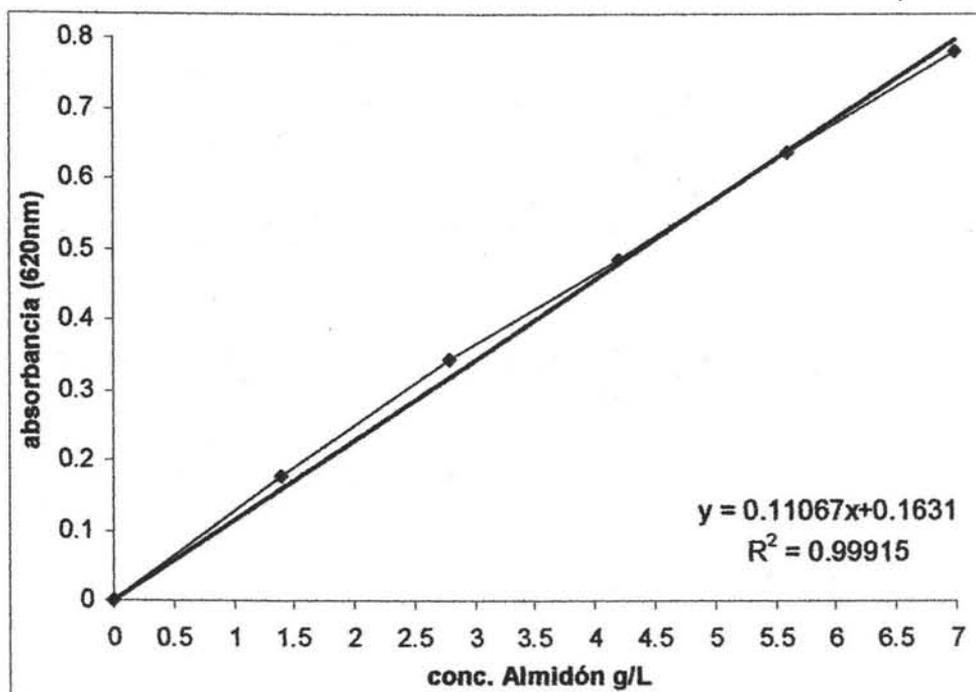


Figura 17. Curva patrón de almidón utilizada para evaluar la actividad amilolítica de la amilasa de *S. infantarius* 25124 por medio del método de extinción del complejo almidón-yodo utilizando almidón (PROLABO 7 g/L).

$Abs_{620\text{ nm}} = P (\text{concentración de almidón g/L}) + \text{ordenada al origen}$

$\text{Concentración de almidón (g/L)} = (Abs_{620\text{ nm}} - \text{ordenada al origen}) / P$