



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 aislada del pozol

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Carolina Rodríguez Saavedra

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Dr. Miquel Gimeno Seco  
Facultad de Química

Ciudad de México. Noviembre, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## RECONOCIMIENTOS

---

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte y de la Dra. Gloria Díaz Ruiz.

El Comité que asesoró y evaluó el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química - UNAM
Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM
Dr. Miquel Gimeno Seco	Facultad de Química - UNAM

Agradecemos al Proyecto PAPIIT UNAM IN 223917, a CONACyT por la Beca de Maestría Nacional de posgrado y al Proyecto CONACyT Ciencia Básica 131615.

Agradecemos al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir y participar en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, celebrando del 21 al 26 de Junio del 2015 en Guadalajara, Jalisco, México.

Agradezco a la Dra. Gloria Díaz Ruiz por el apoyo económico otorgado durante la conclusión de este trabajo.

# AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por abrirme nuevamente las puertas para iniciar mis estudios de posgrado, brindándome un excelente nivel académico y científico, así como la oportunidad de enriquecerme cultural, artística, social y físicamente.

A las Doctoras Carmen Wachter y Gloria Díaz, por todo el apoyo, la paciencia y la confianza que me tuvieron durante la realización de este proyecto.

A los miembros de mi Comité Tutor: la Dra. Romina Rodríguez y el Dr. Miquel Gimeno por las aportaciones, observaciones y críticas que ayudaron a mi desarrollo como investigadora.

A los miembros del Jurado, las Doctoras Amelia Farrés y Carmina Montiel y los Doctores Javier Plasencia, Agustín López-Munguía y Francisco Ruiz Terán por todas las observaciones y sugerencias que ayudaron a que este trabajo culminara satisfactoriamente.

A todos los miembros del Laboratorio de la Dra. Romina Rodríguez del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente a la Dra. Romina Rodríguez, al Dr. Daniel Guillén y a la M. en C. Jocelin Rizo, por apoyarme con protocolos experimentales y reactivos.

A todos los miembros del Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, especialmente al M. en C. Mingyar López y al Dr. Elpidio García por ayudarme incondicionalmente durante mi trabajo experimental, apoyándome con equipo, reactivos, asesorías y consejos.

A la Bióloga Teresa Flores por su amistad, ayuda y apoyo técnico durante todo el trabajo experimental que conllevó este proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio 324: Ricardo, Alejandro, Christopher, Salvador, Elizabeth, Sara, Gaby, Liz, Lili, Carlos y Paulina que me dieron ánimos para seguir, me permitieron desarrollar mi capacidad de enseñanza y me acompañaron con pláticas y risas durante mi trabajo experimental.

A mis amigas del Laboratorio 324: Marisol, Lila, Bárbara, Ana y Karina, que siempre me apoyaron con consejos, conocimiento, protocolos y, sobre todo, con su confianza, sus detalles y todos los momentos que pasamos juntas platicando, riendo y tomando café.

A mi papá y mi mamá. Por apoyarme durante todos estos años de crecimiento académico. Por no dejarme sola, por confiar en mi y tenerme toda la paciencia que siempre es necesaria en el camino de la investigación científica. Gracias por aún ayudarme a levantarme, incluso cuando ya puedo correr.

A mi hermana Elizabeth, porque toda mi vida has sido el apoyo más grande que he tenido en todos sentidos: emocional, personal, económica y académicamente. Eres única. Agradezco a la Vida por habernos unido de esta hermosa manera.

A Mingyar. Por todo lo que eres y lo que me has enseñado a ser. Eres la pieza clave de este proyecto y de mi vida. Gracias por tu conocimiento, tus observaciones, tu incondicionalidad y tu tiempo. Gracias por ser parte de mí vida.

A Sam, Nala, Mau, Mischa y Cappuchino. Porque su compañía siempre alegre, fiel y sin condiciones me acogieron en mis desvelos, mis llegadas y mis ausencias.

*A Teddy.*

*Porque fuiste el más fiel, el más incondicional.  
Has sido el único en la Tierra que me ha amado más  
de lo que se amó a sí mismo*

---

# ÍNDICES

## ÍNDICE DE CONTENIDO

## PÁGINA

---

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	2
El pozol	2
Nixtamalización	3
Microbiología del pozol	3
Bacterias ácido lácticas	4
Bacterias ácido lácticas amilolíticas	4
Género <i>Streptococcus</i>	5
<i>Streptococcus bovis</i>	5
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	6
Maíz	6
Estructura del grano de maíz	7
Almidón	8
Amilosa	9
Amilopectina	10
Pululano	11
Amilasas	13
$\alpha$ -Amilasas	16
Pululanasas	17
Regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos	19
Dominios de unión al almidón	21
<b>Antecedentes y Justificación</b>	24
<b>Hipótesis</b>	26
<b>Objetivos</b>	26
Objetivos particulares	26
<b>Metodología</b>	27
Extracción, separación y concentración de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	27
Reactivación de bacterias y obtención de cultivos frescos de <i>Sii-25124</i>	27
Ensayo de actividad enzimática	27
Extracción enzimático-mecánica de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	28
Efecto de distintos buffers en la eficiencia de la extracción de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	28
Extracción de la amilasa de <i>Sii-25124</i> por lisis celular	28
Electroforesis denaturalizante en geles de poliacrilamida	29
Ensayos de separación y concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	29
Precipitación fraccionada de las proteínas del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> con sulfato de amonio	29
Separación y concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i> usando dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter	30
Concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i> por lisis celular	30

Secuenciación de las amilasas producidas por <i>Sii-25124</i>	30
Caracterización de la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	31
Ensayos de unión a almidón insoluble de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	31
Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	32
Efecto del pH sobre la estabilidad de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	32
Efecto de iones metálicos sobre la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	32
Efecto del sustrato en la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	32
Curso temporal de la hidrólisis del almidón	33
Curso temporal de la producción de azúcares reductores a partir de almidón	33
Efecto de diferentes concentraciones de sustrato sobre la actividad de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	33
<b>Resultados y Discusión</b>	35
Extracción, separación y concentración de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	35
Extracción enzimático-mecánica de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	35
Efecto de distintos buffers en la eficiencia de extracción de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	35
Extracción de la amilasa de <i>Sii-25124</i> por lisis celular	36
Ensayos de separación y concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i>	37
Precipitación fraccionada de las proteínas del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> con sulfato de amonio	37
Separación y concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i> usando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter	39
Concentración de la amilasa de <i>Sii-25124</i> por lisis celular	41
Secuenciación de las amilasas producidas por <i>Sii-25124</i>	43
Amilopululanasa de <i>Sii-25124</i>	45
$\alpha$ -Amilasa citoplásmica de <i>Sii-25124</i>	51
Caracterización de la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	56
Ensayos de unión al almidón insoluble	56
Efecto de la temperatura en la estabilidad de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	60
Efecto del pH sobre la estabilidad de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	62
Efecto de iones metálicos sobre la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	64
Efecto del sustrato en la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	67
Curso temporal de la hidrólisis del almidón y la producción de azúcares reductores a partir de almidón por las amilasas de <i>Sii-25124</i>	68
Efecto de diferentes concentraciones de almidón sobre la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	69

Curso temporal de la producción de azúcares reductores por las amilasas de <i>Sii-25124</i> a partir de amilopectina	71
<b>Conclusiones</b>	73
<b>Bibliografía</b>	74
<b>Anexo I.</b> Medio de cultivo DeMan-Rogosa-Sharpe-Almidón (MRS-A)	88
<b>Anexo II.</b> Determinación de la actividad amilolítica por el método de la extinción del complejo almidón-yodo	89
<b>Anexo III.</b> Preparación de los materiales para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	92
<b>Anexo IV.</b> Preparación de zimogramas con el método de extinción del complejo almidón-yodo	95
<b>Anexo V.</b> Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	97
<b>Anexo VI.</b> Alineamiento entre la amilopululanasa Amy4 y la $\alpha$ -amilasa Amy3 de <i>Sii-25124</i>	99
<b>Anexo VII.</b> Tablas de datos de la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i> frente al pH, la temperatura e iones metálicos	101

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINA

<b>Tabla 1.</b> Tipos de amilasas y sus características	14
<b>Tabla 2.</b> Lista de abreviaturas de las enzimas representativas del clan GH-H	16
<b>Tabla 3.</b> Clasificación y especificidad de las pululanasa	18
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la evaluación del mejor buffer a usar para la Extracción de la actividad amilolítica	35
<b>Tabla 5.</b> Recuperación de actividad amilolítica en cada fracción obtenida por el método enzimático-mecánico	36
<b>Tabla 6.</b> Enriquecimiento de las amilasas de <i>Sii-25124</i> usando precipitación fraccionada con sulfato de amonio	38
<b>Tabla 7.</b> Enriquecimiento de las amilasas de <i>Sii-25124</i> utilizando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter de Merck Milipore	39
<b>Tabla 8.</b> Resultados del enriquecimiento de las amilasas de <i>Sii-25124</i> usando el método enzimático-mecánico para obtener lisados celulares concentrados	42
<b>Tabla 9.</b> Resultados de las secuencias de las bandas Amy3 y Amy4 que se muestran en la Figura 14.	44
<b>Tabla 10.</b> Pululanasa y amilopululanasa con las que se compararon los dominios de la amilopululanasa de <i>Sii-25124</i>	46
<b>Tabla 11.</b> Lista de dominios conservados encontrados en la enzima Amy4 de alta masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i>	47
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de identidad de los dominios de otras pululanasa, amilopululanasa y $\alpha$ -amilasa con respecto a los dominios encontrados en la amilopululanasa de <i>Sii-25124</i>	48



<b>Tabla 13.</b> Identities (%) entre los dominios Amy de la amilopululanasa de <i>Sii-25124</i> y los de otras enzimas pululanasa, amilopululanasa y $\alpha$ -amilasas de otros microorganismos	51
<b>Tabla 14.</b> $\alpha$ -Amilasas con las que se compararon los dominios de la $\alpha$ -amilasa de <i>Sii-25124</i> .	52
<b>Tabla 15.</b> Lista de dominios conservados en la enzima Amy3 de baja masa molecular obtenida del lisado celular de <i>Sii-25124</i>	53
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de identidad de los dominios de otras $\alpha$ -amilasas con respecto a los dominios encontrados en la $\alpha$ -amilasa de <i>Sii-25124</i>	55
<b>Tabla 17.</b> Fracciones de los ensayos de unión a almidón insoluble de la amilasa de 250 kDa de <i>Sii-25124</i>	57
<b>Tabla 18.</b> Comparación de la termoestabilidad de las amilasas de <i>Sii-25124</i> con otras amilasas bacterianas	62
<b>Tabla 19.</b> Comparación de la estabilidad frente al pH de las amilasas de <i>Sii-25124</i> con amilasas provenientes de otras especies de bacterias amilolíticas	64
<b>Tabla 20.</b> Comparación del comportamiento de amilasas de bacterias amilolíticas frente a iones metálicos	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

## PÁGINA

<b>Figura 1.</b> Estructura básica del grano de maíz	7
<b>Figura 2.</b> Estructura del almidón	8
<b>Figura 3.</b> Estructura de la amilosa	10
<b>Figura 4.</b> Estructura de la amilopectina	11
<b>Figura 5.</b> Esquemización de las cadenas A, B y C de la amilopectina	11
<b>Figura 6.</b> Estructura del pululano	12
<b>Figura 7.</b> Relación evolutiva del clan GH-H	15
<b>Figura 8.</b> Estructura terciaria de la $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	20
<b>Figura 9.</b> Estructura tridimensional del SBDs	23
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> obtenido por la extracción enzimático-mecánico	37
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de la precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> .	38
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes del sobrenadante del lisado concentrado de <i>Sii-25124</i> con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter	41
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de los sobrenadantes de los lisados celulares de <i>Sii-25124</i> concentrados 10, 25 y 100 veces.	42
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida de la separación de las amilasas de <i>Sii-25124</i> por unión al almidón insoluble.	43
<b>Figura 15.</b> Dominios conservados encontrados en la enzima Amy4 de alta masa molecular obtenida del lisado celular de <i>Sii-25124</i>	47

<b>Figura 16.</b> Dominios conservados encontrados en la enzima Amy3 de baja masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> .	53
<b>Figura 17.</b> Gel de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de las diferentes fracciones del ensayo de unión a almidón insoluble para las amilasas de <i>Sii-25124</i> .	57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

## PÁGINA

<b>Gráfico 1.</b> Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	61
<b>Gráfico 2.</b> Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	62
<b>Gráfico 3.</b> Actividad amilolítica recuperada del sobrenadante del lisado celular de <i>Sii-25124</i> en presencia de diferentes iones metálicos	65
<b>Gráfico 4.</b> Curso temporal de la hidrólisis del almidón por las amilasas de <i>Sii-25124</i> usando el método de extinción del complejo almidón-yodo.	69
<b>Gráfico 5.</b> Curso temporal de la producción de azúcares reductores por las amilasas de <i>Sii-25124</i> usando almidón soluble como sustrato	69
<b>Gráfico 6.</b> Producción de azúcares reductores por parte de las amilasas de <i>Sii-5124</i> incuando en diferentes cantidades de almidón	70
<b>Gráfico 7.</b> Producción de azúcares reductores por parte de las amilasas de <i>Sii-25124</i> incubando en diferentes concentraciones de amilopectina	71
<b>Gráfico 8.</b> Cursos temporales de la producción de azúcares reductores a partir de almidón y amilopectina a 80 mg/mL por parte de las amilasas de <i>Sii-25124</i>	72

# RESUMEN

---

El pozol es una bebida no alcohólica a base de maíz nixtamalizado y fermentado que cuenta con una microbiota dinámica y compleja, cuyas especies predominantes son las bacterias ácido lácticas. *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* es bacteria ácido láctica que se ha identificado desde el inicio hasta el final de la fermentación. En investigaciones previas se logró aislar e identificar en nuestro laboratorio a *S. infantarius* subsp. *infantarius* 25124 (*Sii-25124*) como una cepa amilolítica capaz de producir una amilasa aparentemente de 250 kDa asociada a célula. Este trabajo de investigación se enfocó en el estudio de la actividad amilolítica generada por *Sii-25124*, con la hipótesis de que se encontrarían una o más amilasas con la posible capacidad de utilizar sustratos ramificados y no ramificados.

Se determinaron las mejores condiciones para extraer, separar y concentrar las amilasas de *Sii-25124*. Con la extracción enzimático-mecánica se logró recuperar un 94% de la actividad total de las células en el sobrenadante del lisado celular logrando una concentración de 3.75 veces, además de que permitió encontrar dos enzimas con actividad amilolítica, las cuales, tras su secuenciación y su comparación, se identificaron como una amilopululanasa de membrana celular de 246.32 kDa y una  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de 55.76 kDa.

Posteriormente, ambas amilasas se estudiaron con base en los efectos de diversos factores y a su capacidad para unirse al almidón. En cuanto a esta última característica se vio que, bajo las condiciones aplicadas, se recuperó 7.5% de la actividad amilolítica de la amilopululanasa de *Sii-25124* en el almidón insoluble, con respecto al 100% de la actividad total presente en el sobrenadante del lisado. En cuanto a la estabilidad frente a la temperatura, se observó que la actividad amilolítica de ambas enzimas se mantuvo estable entre 30°C y 45°C. Los cambios de pH mostraron que la actividad se mantuvo estable en un intervalo entre 6.8 y 8.0, mientras que los ensayos con diferentes iones metálicos revelaron una activación en presencia de  $Mg^{2+}$ . Finalmente, se evaluó la actividad de las amilasas frente a almidón y amilopectina, con lo que se observó una mayor velocidad de reacción frente al almidón que frente a la amilopectina, sugiriendo la posible preferencia de las enzimas por el almidón.

Los resultados obtenidos revelaron la producción de dos amilasas producidas por *Sii-25124*, siendo una de ellas una amilopululanasa con capacidad desramificante y la segunda una  $\alpha$ -amilasa. Estos hallazgos podrían sugerir que la participación de *Sii-25124* es importante al inicio de la fermentación del pozol, dada su posible actividad sobre enlaces  $\alpha(1-6)$  y sobre un almidón desestructurado pero insoluble, ya que podría generar los oligosacáridos suficientes para que otras bacterias lácticas no amilolíticas encuentren las condiciones para colonizar el medio y llevar a término la fermentación del pozol.

# INTRODUCCIÓN

## EL POZOL

---

El pozol (del náhuatl *pozolli*, espumoso) es una bebida no alcohólica elaborada a base de maíz nixtamalizado fermentado que se consume desde la época prehispánica en la región Maya de nuestro país. Formaba parte de la dieta básica de los indígenas de dichas regiones (mayas, principalmente). Hoy en día sigue siendo consumido por grupos étnicos quienes lo siguen utilizando como alimento básico y como provisión en viajes largos debido a su alto grado de conservación; además, también es usado con fines medicinales para bajar la fiebre y controlar la diarrea. Existen variantes del pozol, como el chorote, al cual se le agregan granos de cacao molido a la masa de maíz. Así mismo, se le pueden adicionar otros saborizantes, sal, azúcar, miel o chile (Wacher-Rodarte, 1993; Nuraida *et al.* 1995; Flores, 2008).

Por sus características microbiológicas y de procesamiento, el pozol posee atributos nutricionales diferentes al maíz y a otros productos fermentados de origen amiláceo, como por ejemplo un mayor contenido en proteína cruda, niacina, riboflavina, lisina y triptófano, además de la presencia de bacterias ácido lácticas, que se ha visto que mejoran la digestibilidad de proteínas, aumentan la biodisponibilidad nutricional de minerales y otros nutrientes, además de que realzan las características organolépticas del producto final (Wacher-Rodarte, 1993; Peyer *et al.*, 2016).

La preparación del pozol comprende varias etapas, siendo una de ellas la nixtamalización, misma que reduce de manera importante los mono y disacáridos que se encuentran de forma natural en el maíz; por tanto, el almidón se convierte en el principal carbohidrato disponible para iniciar la fermentación, proceso que se lleva a cabo de forma espontánea.

### **Nixtamalización**

La palabra nixtamalización proviene del náhuatl *nixtli*, cenizas, y *tamalli*, masa. Es un proceso tecnológico implementado por las culturas Mesoamericanas en el que se adiciona una solución de hidróxido de calcio 1%-3% a los granos de maíz, en una proporción 2:1 (agua: maíz). Esta preparación se cuece durante 50 a 90 minutos y se deja remojando de 14-18 horas. Tras el remojo, el nejayote o agua de cocción se retira y los granos de maíz se lavan dos o tres veces con agua común, obteniéndose así el maíz nixtamalizado o nixtamal. Posteriormente, el nixtamal es molido para producir la masa que se ocupará para la preparación de diversos productos, como tortillas, tamales, totopos, tostadas, etc., así como otros platillos (Sefa-Dedeh, *et al.*, 2004; Paredes *et al.* 2009; Bello-Pérez *et al.*, 2014).

La nixtamalización tiene diversos efectos, tanto físicos y químicos, como nutricionales sobre el grano de maíz. En primer lugar, la cocción en hidróxido de calcio es de tipo alcalina, por lo que ésta, aunada al remojo, provocan la disolución y el hinchamiento de las capas del pericarpio, haciendo que las paredes celulares y la fibra dietética se debiliten, facilitando su remoción y

disminuyendo el contenido de fibra insoluble en la masa, pero aumentando el contenido de fibra soluble (0.9% en el maíz a 1.3% en la masa). La membrana semipermeable alrededor del grano, la aleurona, permanece en su lugar durante el tratamiento, reduciendo así la pérdida de nutrimentos por lixiviación. Por otro lado, la concentración de azúcares disminuye del 2% inicial en el grano entero al 0.1% base seca en la masa nixtamalizada, mientras que el almidón sigue siendo el componente mayoritario de la masa; sin embargo, sufre cambios en su gelatinización, ya que se retarda debido a una probable interacción del calcio con la amilosa. Posterior al cocimiento, el almidón se retrograda generándose un almidón desestructurado con respecto al almidón inicial (Paredes *et al.*, 2009).

La cocción alcalina con hidróxido de calcio produce un incremento importante en el contenido de calcio en el nixtamal, aumentándolo de 1 mg de calcio por 100 g de grano de maíz, hasta 138 mg de calcio por 100 g de masa nixtamalizada (Serna-Saldivar *et al.*, 1991).

## Microbiología del pozol

La microbiota del pozol es compleja y dinámica, pues cambia con el avance de la fermentación, además de que hay una diversidad importante de microorganismos. Las especies predominantes son las bacterias ácido lácticas, entre ellas especies no amilolíticas como *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* y *Weissella confusa*; y especies amilolíticas como *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus infantarius*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum* (Nuraida *et al.*, 1995; Ampe *et al.*, 1999; Ben-Omar *et al.*, 2000; Escalante *et al.*, 2001; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a). De todas ellas, la especie que está presente en todas las etapas de fermentación es *Streptococcus infantarius* (Ben-Omar *et al.*, 2000; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a).

La distribución de la microbiota es muy diversa en las diferentes zonas del pozol. En general las bacterias ácido lácticas son las predominantes tanto en la periferia, como en la zona intermedia y en la zona central (Ampe *et al.*, 1999). De aquí, el género *Streptococcus* se encuentra entre el 25 y el 50% de la población total activa del pozol (Ampe *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2001).

La comunidad microbiológica del pozol es dinámica durante el proceso de fermentación de la bola de nixtamal. Se divide en tres etapas principales: la primera, comprendida desde el inicio de la formación de la bola de nixtamal hasta las primeras 24 horas, posee una microbiota inicial consecuencia de la inoculación natural de la masa durante el proceso de molienda (Wacher *et al.*, 1993; Ben-Omar *et al.*, 2000). En esta etapa se encuentra presente *Streptococcus infantarius* y se distinguen bacterias de los géneros *Enterococcus* y *Exiguobacterium*. La segunda etapa corresponde al intervalo entre las 24 y las 48 horas de fermentación; en ésta comienzan a desarrollarse bacterias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas, como especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, especialmente la especie *L. fermentum*; la especie *S. infantarius* también está presente en esta etapa. Finalmente, la tercera etapa (48 a 96 horas) se caracteriza por un decremento en la concentración de BALs heterofermentativas y el desarrollo de BALs homofermentativas, como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* y especies de *Bifidobacterium*, de las cuales ninguna se detecta en etapas más tempranas de la fermentación, en contraste con *S. infantarius* que sigue prevaleciendo en esta etapa (Ben Omar *et al.*, 2000; Díaz-Ruiz, 2003a).

## BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

---

Las bacterias ácido lácticas (BALs) son un grupo de microorganismos que comparten características importantes en común: son bacilos o cocos Gram positivos, no móviles, no esporulados y catalasa negativa, con la capacidad de fermentar los azúcares para originar, como producto final de su metabolismo, ácido láctico; en este sentido, pueden subdividirse en homofermentativas y en heterofermentativas, siendo las BAL heterofermentativas aquellas que además de producir ácido láctico, también producen CO<sub>2</sub>, acetato y etanol (Cabeza, 2006; Patrick, 2012; Todar 2012). Este grupo de bacterias no posee porfirinas ni citocromos en su membrana plasmática, por lo que obtienen su energía vía fosforilación a nivel de sustrato. Son bacterias anaerobias aerotolerantes y son también nutricionalmente exigentes, pues obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares, por lo que están restringidas a crecer en presencia de ellos, además de que requieren medios ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Brock, 2003). Pese a que existen diversos microorganismos capaces de producir ácido láctico como producto final de su fermentación, el grupo de las bacterias ácido lácticas se restringe a géneros dentro del orden de los Lactobaciliares, incluyendo a: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Todar, 2012).

Las BALs se distribuyen en diversos ambientes, como el rumen de bovinos, el tracto intestinal de mamíferos, plantas, materia prima cruda, etc., lo que revela su capacidad de adaptación y de dominancia frente a otro tipo de microorganismos.

### **Bacterias ácido lácticas amilolíticas**

Dentro de las bacterias ácido lácticas se encuentra un grupo que ha ganado especial interés por su capacidad de degradar el almidón de materia prima como papa, maíz, yuca, sorgo y arroz: las bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en alimentos fermentados ricos en almidón y materiales crudos; además, comprenden un grupo bien conocido de microorganismos no patógenos. Sin embargo, son poco frecuentes en la naturaleza, y por lo mismo son considerados como “raros” (Reddy *et al.*, 2008; Fossi y Tavea, 2013; Petrova *et al.*, 2013) y aunque cada vez se han estudiado más, sólo se conocen tres géneros principales con esta capacidad: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Petrova *et al.*, 2013), siendo las cepas del género *Lactobacillus* las que más frecuentemente se han reportado como amilolíticas (Olympia *et al.*, 1992 y 1995; Hamad *et al.*, 1997; Agati *et al.*, 1998; Muyanja *et al.*, 2003 y Petrova *et al.*, 2010). La investigación dedicada a encontrar más BALs amilolíticas en este tipo de nichos ha ido en aumento debido a su atractivo tecnológico para la producción de ácido láctico por la facilidad tanto económica como industrial que supone obtener ácido láctico a partir de un sustrato altamente rentable como lo es el maíz; y como cultivos iniciadores para la elaboración de los alimentos tradicionales de donde provienen o para aprovecharlas en la producción de otros (Reddy *et al.*, 2008).

En países en desarrollo el consumo de alimentos fermentados a base de cereales y otros alimentos, como la yuca, son los de mayor acceso entre la población. La presencia de bacterias ácido lácticas es ventajosa debido a que éstas aumentan el valor nutricional del alimento y su sabor, además de que su preparación permite cierto ahorro de energía (Petrova, *et al.*, 2013). Si aunado a esto existen también bacterias lácticas amilolíticas, la viscosidad en estos alimentos (ocasionada por la alta concentración de almidón) se reduce de forma importante gracias a la presencia de dichas bacterias que, además, aumentan el contenido energético (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003b).

## **Género *Streptococcus***

El género *Streptococcus* comprende bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles, oxidasa y catalasa negativa, que forman parte del grupo de las bacterias ácido lácticas. Se caracterizan por formar cadenas cortas o de pares de cocos con diámetros de 0.7-0.9  $\mu\text{m}$ , crecen a una temperatura óptima de 37-40°C aunque también logran hacerlo a 52°C. Muchas de las especies de este género son anaerobias facultativas y homofermentadoras, por lo que el producto final de su metabolismo es ácido láctico, logrando reducir el pH del medio hasta 4.0 (Ray y Bhunia, 2008).

### ***Streptococcus bovis***

La especie *Streptococcus bovis* es comensal normal del rumen de bovinos que prolifera rápidamente cuando la dieta de los animales cambia de follaje a granos, pudiendo alcanzar cuentas de hasta  $10^{10}$  UFC/mL generando acidosis por lactato, un desorden digestivo resultado de una fermentación rápida del almidón, así como una sobre-producción de ácido láctico junto con una disminución importante del pH (Freer, 1993).

*S. bovis* se encuentra entre las especies más amilolíticas que habitan el rumen de bovinos, por lo que se piensa que puede ser uno de los principales causantes de la acidosis por lactato. Las cepas que se han estudiado por su capacidad amilolítica son *S. bovis* JB1 y *S. bovis* 148. *S. bovis* JB1 produce una amilasa extracelular cuyo peso molecular es de 75 kDa, su punto isoeléctrico de 4.5, su pH óptimo de 5.0 a 6.0 y es estable a menos de 50°C. Esta bacteria cuenta con una amilasa asociada a célula obtenida al crecer a la bacteria en medio con almidón, de la cual no se ha investigado aún (Freer, 1993). Por otro lado, un análisis de su genoma indicó que *S. bovis* JB1 contiene un gen que codifica para una amilopululanasa de aproximadamente 243 kDa, de la cual no hay datos *in vivo* hasta la fecha (Benahmed *et al.*, 2014).

Por otro lado, la cepa *S. bovis* 148, aislada de rumen bovino, produce dos amilasas: AmyA,  $\alpha$ -amilasa extracelular capaz de adsorberse al almidón crudo; y AmyB,  $\alpha$ -amilasa intracelular, incapaz de adsorberse a dicho sustrato. La producción de la amilasa extracelular siempre excede a la de la intracelular en unas 140 a 600 veces. La falta de una secuencia señal para exportación así como de un anclaje a membrana puede indicar que se trata de una amilasa citoplasmática. En contraste, AmyA sí posee una secuencia señal de transporte al exterior celular. Ambas poseen una buena capacidad de hidrolizar el almidón soluble, pero AmyA puede, además, hidrolizar de forma importante el almidón crudo. AmyA se produce en grandes cantidades cuando la bacteria crece en

medio con almidón soluble o maltosa, pero no se produce cuando se usa celobiosa o glucosa. Su secuencia de aminoácidos presenta 85% de homología con la amilasa de *S. bovis* JB1, además de que también presentó similitud con amilasas extracelulares de licuefacción provenientes de cepas de *Bacillus*. (Sato *et al.*, 1997).

*Streptococcus bovis* y *Streptococcus infantarius* guardan una estrecha relación filogenética, ya que *S. infantarius* se identificó como especie a partir de una cepa de *S. bovis* que mostraba diferencias con respecto a la cepa tipo (Schlegel *et al.*, 2000).

### ***Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius***

*Streptococcus infantarius* se diferenció como especie a partir de variantes atípicas de *S. bovis*, describiéndose finalmente como una bacteria  $\alpha$ -hemolítica, que no produce exopolisacáridos y es positiva en la prueba de Voges-Proskauer. Es negativa en las pruebas de arginina dihidrolasa, alcalinofosfatasa y pirrolidonil-arilamidasa. La hidrólisis de esculina es variable. La mayoría de las cepas son  $\alpha$ -galactosidasa positiva y son N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, glicil-triptofano-arilamidasa y  $\beta$ -manosidasa negativas. Todas las cepas de esta especie producen ácido a partir de lactosa, maltosa y sacarosa, pero no de arabinosa, arabitol, ciclodextrina, inulina, D-manitol, ribosa, sorbitol, D-tagatosa o trehalosa.

*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (aislada de heces fecales de niños) posee la característica de no hidrolizar la esculina, además de que es  $\beta$ -glucosidasa y metil  $\beta$ -D-glucopiranosidasa negativa y produce ácido a partir de glicógeno, melobiosa, pululano y almidón (Schlegel *et al.* 2000).

*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* se aisló del pozol, siendo inicialmente identificada como *S. bovis* (Díaz, 2003); sin embargo, el análisis de la secuencia de la región V1 del gen ribosomal 16S indicó que la identidad de la cepa correspondía a la de *S. infantarius* subsp. *infantarius*. Aunado a esto se identificó como la bacteria predominante durante todo el proceso de fermentación. Díaz-Ruiz (2003a) reportó a la cepa de *S. infantarius* 25124 como una BAL amilolítica; sin embargo, no se ha ahondado más sobre esta característica de la especie.

## **MAÍZ**

---

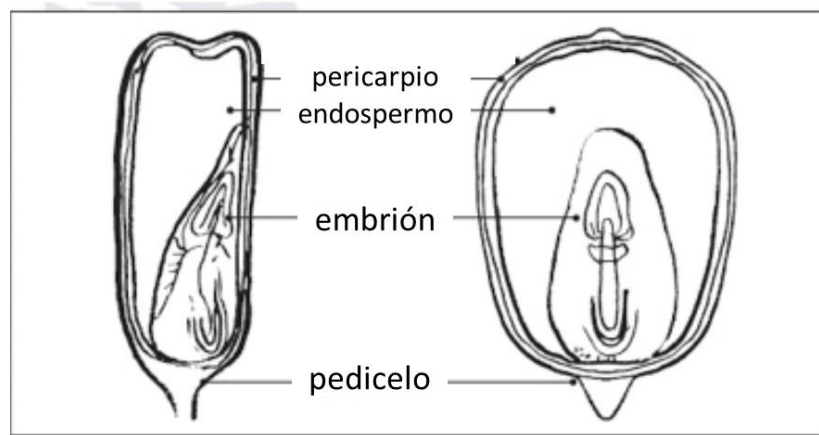
El maíz (*Zea mays*) es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas que se da anualmente. Su nombre tiene origen indio-caribeño y significa “lo que sustenta la vida”. Junto con el trigo y el arroz, el maíz es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana y animal, además de que es materia prima básica en la industria de la transformación, pues de él se obtienen almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y combustible (FAO, 1993).



## Estructura del grano de maíz

La planta de maíz puede definirse como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos (FAO, 1993).

El grano de maíz cuenta con tres estructuras físicas fundamentales: pericarpio (5-6% del grano), endospermo (80-85%) y embrión (10-12%) (Figura 1). El pericarpio se caracteriza por su alto contenido en fibra cruda, que alcanza aproximadamente el 87% y consta principalmente de hemicelulosa. Contrariamente, el endospermo, el mayor constituyente del grano, es rico en almidón (87%), pero también posee alrededor de un 8% de proteínas y casi 3% de fibra cruda. Finalmente, el embrión tiene un buen contenido de grasas crudas (33%), proteínas (casi 20%, de las cuales casi en su totalidad son albúminas y globulinas) y minerales (10.5%) (FAO, 1993; Paliwal *et al.*, 2001; Paredes *et al.*, 2009; López, 2012).



**Figura 1.** Estructura básica del grano de maíz. (Tomado de Paredes *et al.*, 2009).

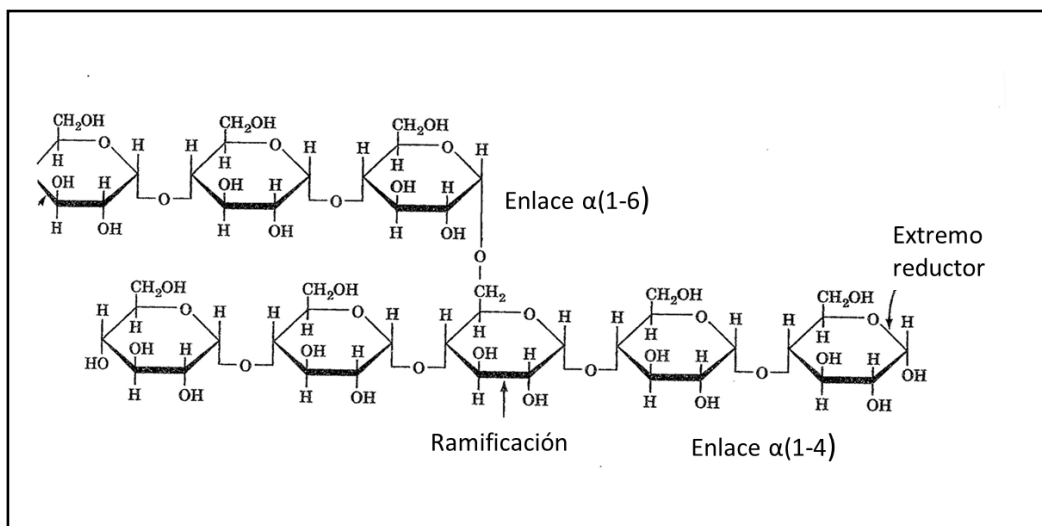
En promedio, el contenido total de proteína en el maíz es del 10%. De éstas, el 90% está constituido por zeína (una prolamina) y glutelina, mismas que se encuentran principalmente en el endospermo. Estas proteínas son deficientes en lisina y triptófano, pero de alto contenido en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (FAO, 1993; Paredes *et al.*, 2009). En cuanto a lípidos, el grano de maíz contiene aproximadamente 5%, mismos que se concentran en el endospermo. Por otro lado, en cuanto a vitaminas contiene principalmente  $\beta$ -caroteno (vitamina A) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), así como vitaminas del grupo B: tiamina, riboflavina y principalmente niacina (Serna-Saldivar y Pérez-Carrillo, 2016); sin embargo, ésta última no se encuentra en forma disponible para ser asimilada por el organismo humano (Paredes *et al.*, 2009).

Respecto a minerales, el grano posee alrededor de 78% de éstos, entre los que destacan el fósforo con aproximadamente 210 mg/100 g de grano entero, potasio (287 mg/100 g de grano entero), hierro (niveles variables dependiendo de la raza, condiciones de cultivo, etc.), magnesio (127 mg/100 g), sodio (35 mg/100 g), selenio (15.5 mg/100 g), calcio (7 mg/100 g) y zinc (2.21 mg/100 g) (Suri y Tanumihardjo, 2016).

Finalmente, el almidón, componente mayoritario del grano, se encuentra en promedio entre el 72-87% de la masa del grano, dependiendo de la raza, las condiciones de cultivo, etc. En general puede decirse que el almidón de maíz posee un 27% de amilosa y un 73% de amilopectina (Paredes *et al.*, 2009).

## Almidón

El almidón es uno de los dos homopolisacáridos más importantes y abundantes en la naturaleza, y comprende el principal polisacárido de reserva en células vegetales. Se encuentra en forma de gránulos citoplásmicos y también dentro de plastos, incluidos los cloroplastos, y es utilizado por casi todos los organismos vivos en este planeta como fuente de energía (Taniguchi y Honnda, 2009). Está formado únicamente por moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa unidas entre sí a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6); la presencia de uno u otro tipo de enlace divide al almidón en dos estructuras: amilosa y amilopectina (Figura 2). La proporción amilosa:amilopectina en el almidón varía mucho dependiendo de la fuente. Por ejemplo, existen variedades de maíz con granos de hasta 50% de amilosa, mientras que los maíces “cerosos” apenas y poseen un 3% de ésta (Chaplin, 2016).



**Figura 2.** Estructura del almidón (Tomado y modificado de Manisha, 2017)

La molécula de almidón no cocido forma una estructura muy organizada que presenta birrefringencia y dada su alta organización, el almidón es por naturaleza insoluble en agua. Las partículas de almidón son capaces sólo de absorber una pequeña cantidad de agua que supone un cambio mínimo en el gránulo que es reversible si el almidón se deja secar y no se ha cocido. Sin embargo, si la suspensión de almidón se calienta, se induce un fenómeno conocido como imbibición, esto es, la incorporación de agua en los gránulos de almidón. Dicha incorporación va ocurriendo gradual y reversiblemente primero en las zonas menos densas y después en las áreas más cristalinas. Mientras el calentamiento continúa, los gránulos de almidón empiezan a captar agua de manera

irreversible hinchándose y provocando su ruptura. Este proceso se conoce como gelatinización y es responsable del espesamiento en los sistemas alimenticios. Las soluciones de almidón gelatinizado son opacas, frágiles y la estructura altamente organizada y cristalina del almidón se pierde (Vaclavik *et al.*, 1998; García-Villanova *et al.*, 2010).

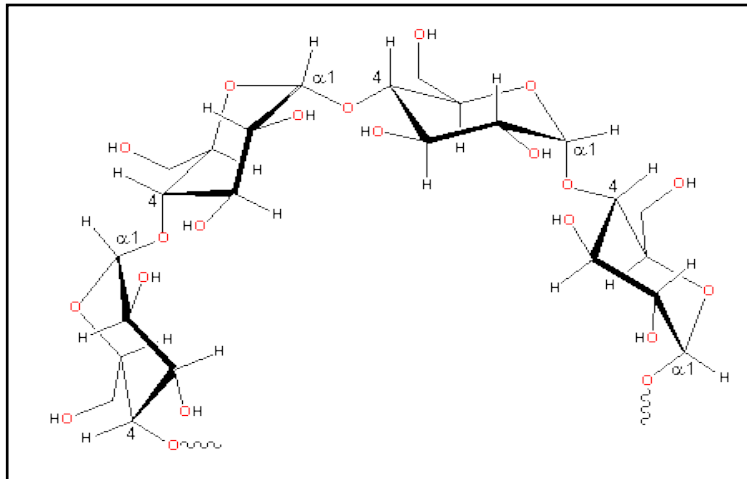
La función biológica de este polisacárido en las plantas es la de almacenamiento: cuando es necesaria una fuente de carbono y energía, se libera almidón de los gránulos y las enzimas lo degradan exhaustivamente hasta obtener monómeros de glucosa, que es inmediatamente introducida en la vía de la glucólisis para obtener energía en forma de ATP (Bohinski, 1998). Las enzimas encargadas de utilizar el carbono para obtener la energía almacenada en el almidón reciben el nombre de amilasas, mismas que se encuentran en plantas, animales y microorganismos. Dada la importancia del almidón en la industria, las amilasas han sido ampliamente estudiadas con el fin de poder mejorar el rendimiento y reducir los costos de los procesos industriales en los que se ven involucradas.

## **Amilosa**

Las moléculas de amilosa consisten en cadenas sencillas no ramificadas con 500-20,000 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha(1-4)$ . Dependiendo de la fuente de almidón, la amilosa puede contener algunas uniones  $\alpha(1-6)$  así como grupos fosfato, aunque ninguno de éstos afecta el comportamiento general de la molécula.

La amilosa puede adoptar una forma extendida, pero generalmente tiende a acomodarse en una hélice levógira rígida o formar zonas de juntas paralelas de dobles hélices levóginas, las cuales son conformaciones aún más rígidas. Las hélices sencillas de amilosa poseen puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno dos con el átomo de carbono seis en la superficie exterior de las hélices. Los puentes de hidrógeno formados entre cadenas alineadas causan la retrogradación y liberan agua por sinéresis. De esta forma, las cadenas forman cristales de doble hebra, con una mayor cantidad de puentes de hidrógeno, lo que genera una estructura muy hidrofóbica y de baja solubilidad (Chaplin, 2016).

Las cadenas sencillas de amilosa tienden a comportarse como las ciclodextrinas al poseer una superficie interna relativamente hidrofóbica capaz de retener moléculas de agua, las cuales puede perder con facilidad para ser reemplazadas por moléculas aromáticas o lipídicas (hidrofóbicas) cuando forma una estructura en tipo V (Figura 3) que varía en diámetro y empaque, dependiendo del tamaño de moléculas incluidas dentro de la hélice. De esta forma se producen los llamados caltratos o compuestos de inclusión helicoidal. Esta estructura también es la responsable de la unión a iones yodo, los cuales se unen a la hélice de amilosa produciendo una coloración púrpura, debida a la interacción donador-aceptor entre el agua y los poli-yoduros, encontrados en el núcleo central de la hélice de amilosa y que se encuentran deficientes de electrones (Hoseney, 1991; Chaplin, 2016).

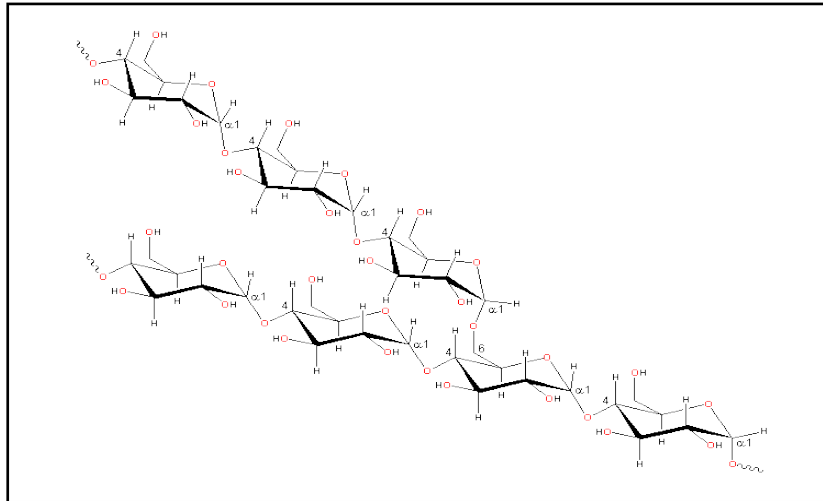


**Figura 3.** Estructura de la amilosa. (Tomado de Chaplin, 2016).

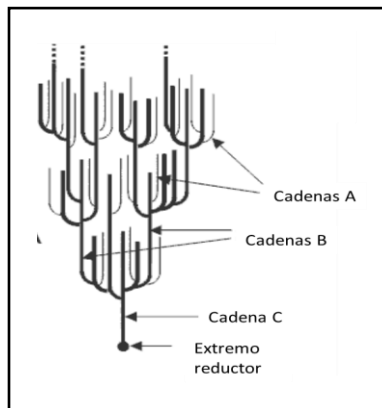
### **Amilopectina**

Formada por ramificaciones no azarasas de enlaces  $\alpha(1-6)$  que ocurren cada 24 a 30 residuos de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$  (Figura 4. Cada molécula de amilopectina contiene alrededor de un millón de residuos; de todo este total, el 5% está conformado por puntos de ramificación. Existen cadenas no ramificadas exteriores, llamadas cadenas A, que se encuentran en mayor proporción que las cadenas B, que son cadenas interiores ramificadas; aunado a esto, presenta una única cadena C, que contiene el único extremo reductor de la molécula (Figura 5).

Las moléculas de amilopectina se orientan de forma radial en el gránulo de almidón; conforme el radio aumenta, también aumenta el número de ramificaciones requeridas para llenar el espacio, con la consecuente formación de regiones concéntricas de estructuras amorfas y cristalinas dispuestas de forma alterna (Chaplin, 2016).



**Figura 4.** Estructura de la amilopectina. (Tomado de Chaplin, 2016).



**Figura 5.** Esquemización de las cadenas A, B y C de la amilopectina. (Tomado y modificado de Chaplin, 2016).

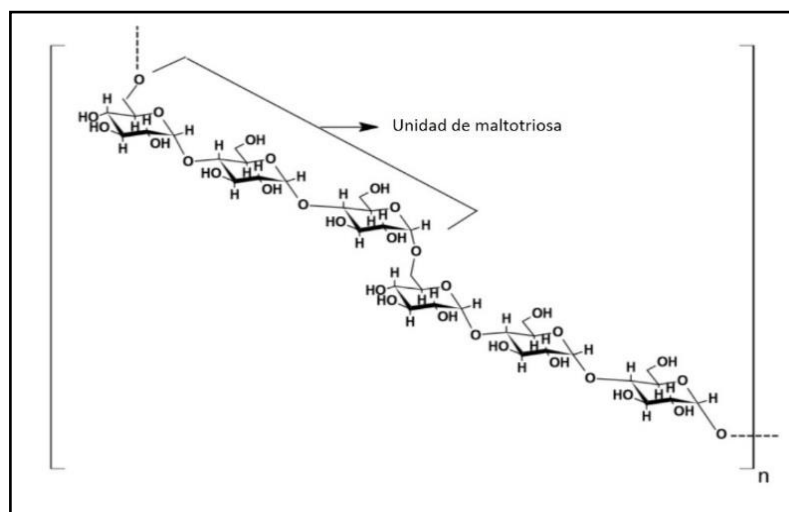
## PULULANO

B. Bernier aisló por primera vez el pululano en 1958. Es una goma de glucano soluble en agua producida aeróbicamente y de manera natural por el hongo *Aerobasidium pullulans* como un exopolisacárido unido a su superficie celular. Está compuesto por unidades de maltotriosa (3 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ ) unidas entre sí por enlaces  $\alpha(1-6)$  (Figura 6), siendo la proporción de ambos enlaces de 2:1, aunque se han podido identificar otras estructuras, como la maltotetraosa (4 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ ) distribuidas al azar dentro de la molécula en un porcentaje máximo del 7%, con respecto al polímero total. Otros autores reportan que los enlaces  $\alpha(1-3)$ ,  $\beta(1-3)$  y  $\beta(1-6)$  también pueden formar parte de la estructura dependiendo del origen microbiológico de la misma (Singh, *et al.*, 2008).

Su estructura alterna entre enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6) le confiere dos propiedades distintivas en cuanto a flexibilidad estructural y solubilidad aumentada. Así mismo, su patrón de enlaces dota al pululano de aspectos físicos especiales, como propiedades adhesivas y capacidad para formar fibras, molduras de compresión y películas fuertes impermeables al oxígeno. Su solubilidad puede controlarse introduciéndole grupos reactivos por derivatización química (Singh *et al.*, 2008). En consecuencia, el pululano y sus derivados tienen numerosas aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica debido a sus propiedades físicas: es soluble y estable en solución acuosa en un intervalo amplio de pH (3-8), se descompone por calor seco carbonizándose a temperaturas de 250-280 °C, se disuelve rápidamente en agua pero es insoluble en solventes orgánicos. Las soluciones de pululano son viscosas pero no forman geles, y tras el secado es capaz de formar películas transparentes, solubles en agua, resistentes a las grasas, inodoras, insaboras y antiestáticas (Dixon *et al.*, 2008).

Las aplicaciones que actualmente tiene este polisacárido son: agente de glaseado, agente formador de películas, espesante o como transportador en la producción de cápsulas para suplementos dietéticos como sustituto de gelatina; como cubierta para tabletas contenedoras de suplementos dietéticos, para la producción de películas comestibles saborizadas utilizadas como refrescantes para el aliento y en la producción de mermeladas, jaleas, dulces y algunos productos cárnicos. Además, también se usa como texturizante en las gomas de mascar y como agente espumante en postres a base de lácteos (Dixon *et al.*, 2008).

El pululano se obtiene vía la fermentación de *A. pullulans* de fuentes complejas de carbono como melaza de betabel, vaina de algarrobo, hidrolizados de cereales, jarabes de maíz, pulpa de cáscara de uva, aceite de oliva y sacarosa, hidrolizados de chícharo, almidón de papa hidrolizado y bagazo de licor. El polisacárido se obtiene como metabolito secundario de células tipo levadura en presencia de una cantidad limitada de amonio, que induce la producción. *Tremella mesentérica*, *Cytaria harioti*, *Cytaria darwinii*, *Cryphonectria parasítica*, *Teloschistes flavicans* y *Rhodototula bacarum* también son productores de pululano (Singh *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Estructura del pululano con maltotriosa como unidad de repetición. (Tomado de Singh *et al.* 2008)

## AMILASAS

---

Las amilasas, de manera general, son un grupo de enzimas que actúan sobre enlaces glucosídicos presentes en almidón y glucógeno (polisacárido similar al almidón), principalmente; por tanto, tienen la capacidad de degradar a dichos polisacáridos hasta convertirlos en azúcares más simples, como oligomaltosas o unidades de glucosa (Taniguchi y Honnda, 2009). La primera amilasa fue descubierta en 1811 a partir de trigo por Gottlieb Kirchhoff, quien realizó un experimento en el que colocó cuatro partes de agua, dos partes de almidón y una parte de malta, creando una pasta viscosa. Tras un tiempo de incubación, la pasta comenzó a licuarse para dar lugar a un jarabe dulce, resultado que mostró la capacidad del almidón para convertirse en grandes cantidades de azúcares. Tras algunos años, se reportaron otras amilasas aisladas de tractos digestivos y de cereales malteados. Y no fue sino hasta 1930 que Ohlsson sugirió la clasificación de las enzimas degradadoras de almidón en  $\alpha$ - o  $\beta$ -amilasas, dependiendo del tipo de azúcar anomérico producido (Gupta *et al.*, 2003).

Existen diversos tipos de amilasas y se clasifican según sus propiedades catalíticas, tales como su sustrato y el producto que liberan. Dado esto, las amilasas pueden clasificarse según tres criterios: según su acción catalítica, como transferasas (EC2), hidrolasas (EC3) e isomerasas (EC5), dentro de las cuales, la mayoría pertenece a la clase EC3.

Según su mecanismo de acción, pueden considerarse de retención o de inversión, dependiendo si conservan su carbono anomérico tras la catálisis o si lo invierten. En este aspecto, la configuración anomérica del sustrato es retenida después de la acción catalítica de las enzimas de retención; mientras que se invierte tras la acción catalítica de las amilasas de inversión. Las  $\beta$ -amilasas y las glucoamilasas son ejemplos de enzimas de inversión, mientras que el resto de las amilasas, incluyendo la  $\alpha$ -amilasa, son enzimas de retención.

Finalmente, según su acción específica sobre las cadenas de  $\alpha$ -glucano, pueden ser exo-amilasas si atacan el enlace  $\alpha(1-4)$  del extremo no reductor de las cadenas de amilosa, generando como producto maltosa o dextrinas límite; o pueden ser endo-amilasas si llevan a cabo la hidrólisis de enlaces internos  $\alpha(1-4)$  en la cadena de amilosa, liberando como productos una mezcla de distintos oligosacáridos de diferente peso molecular (Taniguchi y Honnda, 2009; Rana *et al.*, 2013).

Las amilasas también se han clasificado según el tipo de actividad que tienen sobre el almidón en  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas, ciclodextrin-transferasas, maltodextrin-gluconotransferasas, pululanases, etc.

Debido a la gran cantidad y variedad de enzimas amilasas descubiertas, así como a los datos reportados sobre sus estructuras primaria y terciaria, Henrissat (1991) y Henrissat y Bairoch (1993) propusieron un método de clasificación en donde todas las glucósido-hidrolasas (GH) se agruparon en 110 familias, conocidas como familias GH. De aquí, las amilasas microbianas se encuentran incluidas en cinco familias: GH13, 14, 15, 31 y 77. La Tabla 1 muestra algunos de los tipos de amilasas que se encuentran dentro de estas familias, así como algunas características que las definen (Taniguchi y Honnda, 2009).

De las cinco familias mencionadas, la familia GH13 es la más grande, contando con enzimas que actúan sobre sustratos con enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha$ , con actividad hidrolasa, transglucosidasa e isomerasa. La familia incluye a las  $\alpha$ -amilasas, oligo-1,6-glucosidasas,  $\alpha$ -glucosidasas, pululanasa, ciclomaltodextrinasas,  $\alpha$ -amilasas formadoras de maltotetraosa, isoamilasas, dextrán-glucosidasas, trehalosa-6-fosfato-hidrolasas,  $\alpha$ -amilasas formadoras de maltohexosa,  $\alpha$ -amilasas formadoras de maltotriosa, amilasas maltogénicas, neopululanasa, maltooligosiltrehalosa-trehalohidrolasas, dextrinasas límite,  $\alpha$ -amilasas formadoras de maltopentaosa, amilosacarasa, sacarosa-fosforilasa, enzimas ramificadoras, ciclomaltodextrin-glucanotransferasas, 4- $\alpha$ -glucanotransferasas, isomaltulosa-sintasas y trehalosa-sintasas (Svensson y Janeček, 2014).

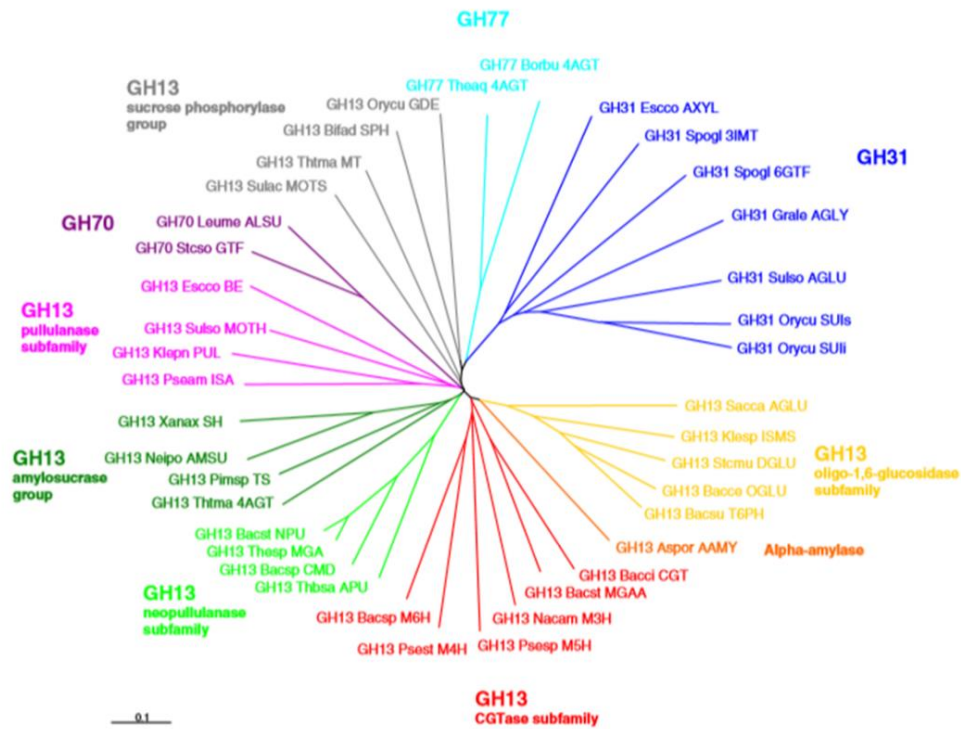
Las amilasas de la familia GH13 poseen similitudes en sus estructuras primaria y secundaria, siendo la presencia cuatro regiones de aminoácidos conservados y de una estructura de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, respectivamente, dos de las similitudes más contundentes. Actualmente, las familias GH13, GH70 y GH77 se han agrupado en un solo grupo, conocido como el clan GH-H, debido a que se cree que comparten un ancestro común (Figura 7), así como un mismo mecanismo catalítico. Las enzimas de este clan poseen los dominios A, B y C, la triada catalítica Asp-Glu-Asp y actúan sobre enlaces  $\alpha(1-4)$ ,  $\alpha(1-6)$ ,  $\alpha(1-1)$ ,  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-5)$  (Kumar, 2011).

**Tabla 1.** Tipos de amilasas y sus características

Nombre	Familia GH	Sub-familia GH 13	Mecanismo	Endo/Exo
$\alpha$ -amilasa	13	1, 2, 5, 7, 19, 27, 28, 32	Retención	Endo
$\beta$ -amilasa	14		Inversión	Exo
Glucoamilasa	15		Inversión	Exo
Oligo-1,6-glucosidasa	13	31	Retención	Endo
$\alpha$ -glucosidasa	13 31	21, 29	Retención	Exo
Amilo-1,6-glucosidasa	13	25	Retención	Exo?
Pululanasa	13	12, 13, 14	Retención	Endo
Ciclomaltodextrinasa	13	20	Retención	Endo
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotetrahidrolasa	13	No clasificada	Retención	Exo?
Isoamilasa	13	11	Retención	Endo
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltohexahidrolasa	13	19	Retención	Exo?
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotriohidrolasa	No clasificada	No clasificada	Retención	Endo
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltohidrolasa	13	20	Retención	Endo
Neopululanasa	13	20	Retención	Endo
4- $\alpha$ -D-glucanotrehalosa trehalohidrolasa	13	10	Retención	Exo?
Enzima ramificante	13	9	Retención	Endo
Ciclomaltodextrin glucotransferasa	13	2	Retención	Endo
4- $\alpha$ -glucanotransferasa	77		Retención	Endo
4- $\alpha$ -glucan-1- $\alpha$ -D-glucosilmutasa	13	26	Retención	Exo?

Tomado y modificado de Taniguchi y Honnda, 2009





**Figura 7.** Relación evolutiva del clan GH-H. El árbol está basado en un alineamiento, en todas las familias, del barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> y el dominio B (442 posiciones de la longitud consenso), calculado con exclusión de los gaps (131 residuos de aminoácidos alineados). La Tabla 2 indica las abreviaturas usadas en la figura de cada amilasa utilizada para la reproducción del árbol. Fuente: Janeček *et al.* (2007)

**Tabla 2.** Lista de abreviaturas de las enzimas representativas del clan GH-H usadas en la representación del árbol filogenético (Figura 7)

Familia	EC	Enzima	Abreviación	Fuente
GH13	3.2.1.1	$\alpha$ -Amylase	GH13-Aspor-AAMY	<i>Aspergillus oryzae</i>
	2.4.1.19	Cyclodextrin glucanotransferase	GH13-Bacci-CGT	<i>Bacillus circulans</i> No.8
	3.2.1.10	Oligo-1,6-glucosidase	GH13-Bacce-ONGLU	<i>Bacillus cereus</i>
	3.2.1.60	Maltotetraohydrolase	GH13-Psest-M4H	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	3.2.1.68	Isoamylase	GH13-Pseam-ISA	<i>Pseudomonas amyloideramosa</i>
	3.2.1.133	Maltogenic amylase	GH13-Thesp-MGA	<i>Thermus</i> sp. IM6501
	3.2.1.133	Maltogenic $\alpha$ -amylase	GH13-Bacst-MGAA	<i>Bacillus stearothersophilus</i>
	3.2.1.141	Maltooligosyltrehalose hydrolase	GH13-Sulso-MOTH	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
	2.4.1.4	Amylosucrase	GH13-Neipo-AMSU	<i>Neisseria polysaccharea</i>
	2.4.1.-	Maltosyltransferase	GH13-Thtma-MT	<i>Thermotoga maritima</i>
	2.4.1.25	4- $\alpha$ -Glucanotransferase	GH13-Thtma-4AGT	<i>Thermotoga maritima</i>
	2.4.1.18	Glucan branching enzyme	GH13-Ascco-BE	<i>Escherichia coli</i>
	3.2.1.54	Cyclomaltodextrinase	GH13-Bacsp-CMD	<i>Bacillus</i> sp. I-5
	3.2.1.135	Neopullulanase	GH13-Bacst-NPU	<i>Bacillus stearothersophilus</i>
	5.4.99.11	Isomaltulose synthase	GH13-Klesp-ISMS	<i>Klebsiella</i> sp. LX3
	5.4.99.15	Maltooligosyltrehalose synthase	GH13-Sulac-MOTS	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
	2.4.1.7	Sucrose phosphorylase	GH13-Bifad-SPH	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	3.2.1.98	Maltohexaohydrolase	GH13-Bacsp-M6H	<i>Bacillus</i> sp. 707
	3.2.1.41	Pullulanase	GH13-Klep-n-PUL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	3.2.1.20	$\alpha$ -Glucosidase	GH13-Sacca-AGLU	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
	3.2.1.1/41	Amylopullulanase	GH13-Thbsa-APU	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>
	3.2.1.70	Dextran glucosidase	GH13-Stcmu-DGLU	<i>Streptococcus mutans</i>
	3.2.1.93	Trehalose-6-phosphate hydrolase	GH13-Bacsu-T6PH	<i>Bacillus subtilis</i>
	3.2.1.116	Maltotriohydrolase	GH13-Nacam-M3H	<i>Natronococcus amylolyticus</i>
	3.2.1.-	Maltopentaohydrolase	GH13-Psest-M5H	<i>Pseudomonas</i> sp. KO-8940
	3.2.1.-	Sucrose hydrolase	GH13-Xanax-SH	<i>Xanthomonas axonopodis</i>
	2.4.1.25/3.2.1.33	Glucan debranching enzyme	GH13-Orycu-GDE	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
5.4.99.16	Trehalose synthase	GH13-Pimsp-TS	<i>Pimelobacter</i> sp. R48	
GH70	2.4.1.7	Glucosyltransferase	GH70-Steso-GTF	<i>Streptococcus sobrinus</i>
	2.4.1.141	Alternan sucrase	GH70-Leume-ALSU	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
GH77	2.4.1.25	4- $\alpha$ -Glucanotransferase	GH77-Theaq-4AGT	<i>Thermus aquaticus</i>
	2.4.1.25	4- $\alpha$ -Glucanotransferase	GH77-Borbu-4AGT	<i>Borrelia burgdorferi</i>
GH31	3.2.1.-	$\alpha$ -Xylosidase	GH31-Escco-AXYL	<i>Escherichia coli</i>
	3.2.1.20	$\alpha$ -Glucosidase	GH31-Sulso-AGLU	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
	3.2.1.48/3.2.1.10	Sucrase-isomaltase	SUI	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
	3.2.1.48	Sucrase subunit	GH31-Orycu-SUIs	
	3.2.1.10	Isomaltase subunit	GH31-Orycu-SUIi	
	2.4.1.-	3- $\alpha$ -Isomaltosyltransferase	GH31-Spogl-3IMT	<i>Sporosarcina globispora</i>
	2.4.1.-	6- $\alpha$ -Glucosyltransferase	GH31-Spogl-6GTF	<i>Sporosarcina globispora</i>
	4.2.2.13	$\alpha$ -1,4-Glucan lyase	GH31-Grale-AGLY	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>

Fuente: Janeček *et al.* (2007)

## $\alpha$ -Amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas tienen un rol muy importante en la industria de alimentos, incluyendo la cervecera y de panificación, así como en industrias textiles, de papel y detergentes, gracias a la termoestabilidad y tolerancia al pH que presentan. Dentro de las  $\alpha$ -amilasas que existen en la naturaleza, las provenientes de bacterias y hongos son las más utilizadas debido a su mayor estabilidad, al bajo costo y alto rendimiento que implica su producción (Rana *et al.*, 2013).

Este tipo de enzima se clasifica dentro de la familia GH13 de las amilasas, se encuentra en una amplia variedad de organismos debido a que el almidón es la principal fuente de energía de la mayoría de los seres vivos. Tiene la capacidad de hidrolizar azarosamente los enlaces  $\alpha(1-4)$  presentes en la parte interna de la estructura de la amilosa y la amilopectina, siendo incapaz de hidrolizar los enlaces  $\alpha(1-6)$ . En la primera etapa de la hidrólisis se producen dextrinas con un peso molecular relativamente alto, haciendo que la viscosidad de la solución de almidón disminuya rápidamente. Conforme la hidrólisis continúa, el grado de polimerización de las dextrinas disminuye gradualmente; finalmente, en la etapa final grandes cantidades de maltosa, maltotriosa, glucosa y oligosacáridos (dextrinas límite) con enlaces  $\alpha(1-6)$ , todos con configuración  $\alpha$ , son los productos de la hidrólisis (Taniguchi y Honnda, 2009).

Las enzimas de este grupo se han purificado y caracterizado a partir de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo archeas, como *Sulfolobus*, procariontes como *Bacillus* y eucariontes como *Aspergillus*. La mayoría de las enzimas estudiadas tienen una actividad máxima a pH neutro y entre 30-37°C; sin embargo, dependiendo de las condiciones óptimas del microorganismo, algunas exhiben actividad a pHs tan bajos como 2.0 o tan altos como 12.0, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de *Alcylobacillus acidocaldarius* presenta una actividad óptima a pH 3.0, mientras que la amilasa de la bacteria alcalófila *Bacillus* sp. GM8901 reporta una actividad óptima a pH de 12.0. En cuanto a temperatura, se han encontrado amilasas con actividades máximas a 100°C, como la de *Pyrococcus furiosus* (Rana *et al.*, 2013).

Las  $\alpha$ -amilasas son metaloenzimas, así que por lo general tienen al menos un ión  $\text{Ca}^{2+}$  formando parte de su estructura con la capacidad de ligar hasta diez iones  $\text{Ca}^{2+}$ , como es el caso de la Taka-amilasa A. Los iones calcio añaden estabilidad a la enzima e incluso pueden conferirle termoestabilidad, debido al efecto "salting out" que le da el  $\text{Ca}^{2+}$  a los residuos hidrofóbicos de la proteína, lo que la hace adoptar una forma más compacta y por ende más termoestable (Gupta *et al.*, 2003; Rana *et al.*, 2013). Existen estudios en los que se muestra la capacidad de otros iones, como el  $\text{Sr}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$ , de reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$ , así como reportes en los que se observa que el  $\text{Ca}^{2+}$  no tiene efecto alguno sobre la actividad o estabilidad de la enzima (Oikawa, 1959; Giraud *et al.*, 1993; jehah *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2003).

Las enzimas producidas por *Bacillus* sp. y *Aspergillus* sp. son de las más estudiadas e investigadas para la producción de amilasas, debido a la estabilidad que presentan y al estatus GRAS que han adquirido, siempre y cuando no se trate de especies patógenas como *Bacillus cereus* o *Aspergillus flavus* (Sun *et al.*, 2009). En este sentido, las  $\alpha$ -amilasas provenientes de bacterias ácido lácticas amilolíticas no han sido estudiadas lo suficiente, pese a que históricamente carecen de patogenicidad y a que son capaces de fermentar en un buen número de alimentos ricos en almidón (Giraud *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2000; Wasko *et al.*, 2010).

## **Pululanasa**

Las pululanasa, también llamadas  $\alpha$ -dextrin-6-glucanohidrolasas, forman parte del grupo de enzimas desramificantes clasificadas dentro de la familia GH13 de las amilasas, las cuales son capaces de hidrolizar el enlace  $\alpha(1-6)$  en pululano, almidón y amilopectina. De manera específica, las pululanasa actúan sobre el pululano, hidrolizando principalmente el enlace  $\alpha(1-6)$  o el enlace

$\alpha$  (1-4), aunque también pueden tener la capacidad de atacar otro tipo de polisacáridos (Taniguchi y Honnda, 2009). Hasta la fecha se han reportado cinco grupos de este tipo de enzima, clasificadas según la especificidad de su sustrato y sus productos de reacción. La Tabla 3 muestra un resumen de dicha clasificación.

Se han podido purificar y caracterizar pululanases de diversos microorganismos. Como se muestra en la tabla 9 la pululanasa tipo I se ha caracterizado de bacterias mesofílicas como *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus acidopullulyticus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptomyces* spp. También se han aislado de bacterias moderadamente termofílicas, como *Bacillus flavocaldarius* y *Clostridium* spp.; así como también de bacterias hipertermofílicas como *Frevidobacterium pennavorans* (Hii et al., 2012).

La pululanasa tipo II se encuentra ampliamente distribuida entre bacterias termofílicas y archaeas hipertermofílicas. Las amilopululanases más termoestables y termoactivas reportadas son de las archaea *Pyrococcus woesei* y *Pyrococcus furiosus*. La temperatura óptima para estas enzimas se encuentra un rango de 85°C a 105°C, manteniendo su actividad incluso en ausencia de iones  $\text{Ca}^+$ . También se han reportado las pululanases de *Thermococcus litoralis*, *Desulfurococcus mucosus* y *Thermococcus celer*. Este tipo de pululanases se clonan en *E. coli*, expresando la enzima funcional y mostrando actividad con 5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  de 130°C a 140°C (Hii et al., 2012).

**Tabla 3.** Clasificación y especificidad de las pululanases

Enzima	Enlaces hidrolizados	Sustratos	Productos finales	Microorganismos productores
<b>Pululanasa Tipo I</b>	$\alpha$ (1-6)	Pululano Polisacáridos ramificados	Maltotriosa	<i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Bacillus acidopullulitycus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Bacillus flavocaldarius</i> <i>Bacillus thermoleovorans</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>Thermos caldophilus</i>
<b>Pululanasa Tipo II (amilopululanasa)</b>	$\alpha$ (1-6) $\alpha$ (1-4)	Pululano Almidón, amilopectina, amilosa	Maltotriosa Glucosa, maltosa y maltotriosa	<i>Pyrococcus woesei</i> <i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Thermococcus litoralis</i> <i>Desulfurococcus mucosus</i> <i>Thermococcus celer</i>
<b>Pululan-hidrolasa Tipo I (neopululanasa)</b>	$\alpha$ (1-4)	Pululano	Panosa	<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacillus polymyxa</i> CECT 155
<b>Pululan-hidrolasa Tipo II (isopululanasa)</b>	$\alpha$ (1-4)	Pululano	Isopanosa	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 <i>Bacillus</i> spp. US 149
<b>Pululan-hidrolasa Tipo III</b>	$\alpha$ (1-4) y $\alpha$ (1-6)	Pululano Almidón, amilosa y amilopectina	Panosa, maltosa, maltotriosa. Maltotriosa y maltosa.	<i>Thermococcus aggregans</i>

Tomado y modificado de Hii et al., 2012.

Por otro lado, se han purificado las neopululanastas de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacillus polymyxa* CECT 155. Las isopululanastas se han encontrado en *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Bacillus* spp. US 149; y finalmente, sólo se tiene reportada una pululan-hidrolasa tipo III: la de la archaia hipertermofílica *Thermococcus aggregans* (Hii *et al.*, 2012).

Algunas bacterias lácticas amilolíticas también producen pululanastas, en específico amilopululanastas, como el caso de *Lactobacillus amylophilus* GV6, *Lactobacillus paracasei* B41 y *Lactobacillus plantarum* L137; esta última con un peso molecular de 216 kDa (Vishnu *et al.*, 2006; Hii *et al.*, 2012; Petrova *et al.*, 2012 y 2013).

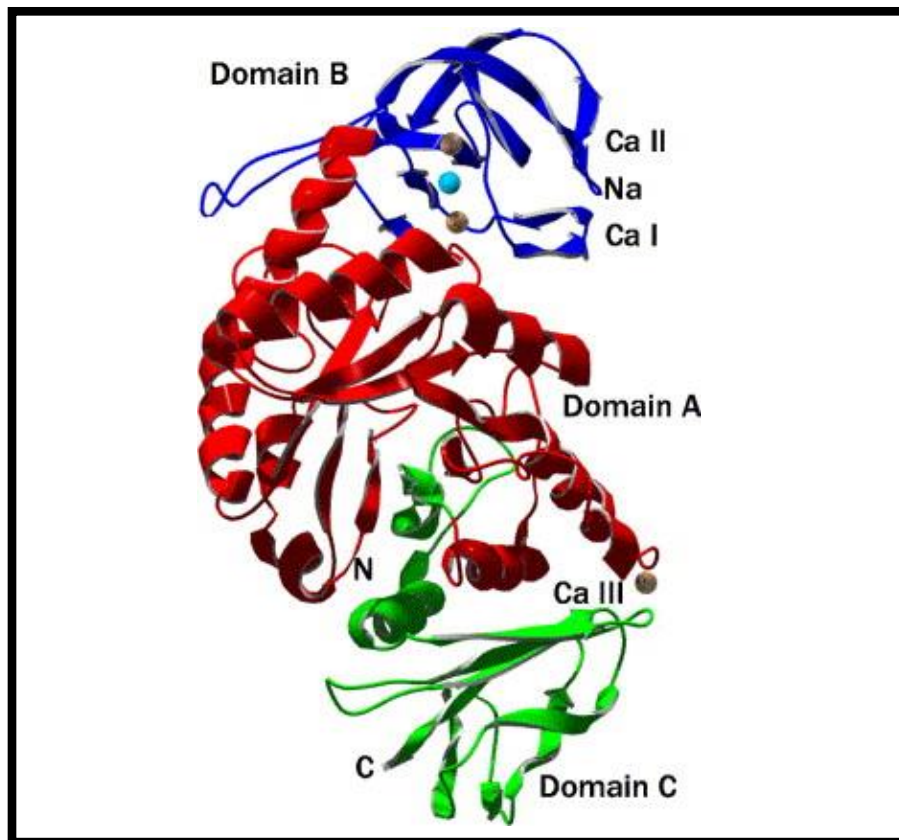
La aplicación de las pululanastas en la industria ha ganado interés debido a la facilidad que brindan al proceso de sacarificación del almidón al hidrolizar los enlaces  $\alpha$  (1-6), permitiendo la producción de maltosa, amilosa y glucosa, con o sin el uso de  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas o glucoamilasas, respectivamente. También se les ha encontrado aplicación en la elaboración de cervezas bajas en calorías, en panadería como agente anti-salado para mejorar la textura, el volumen y el sabor de los productos horneados, y como agente de control de placa dental (Hii *et al.*, 2012).

## Regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de las amilasas

La primera amilasa en ser secuenciada fue la Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae* A por Matsuura *et al.* (1984). A partir de entonces se ha obtenido la secuencia de otras  $\alpha$ -amilasas como las producidas por *Aspergillus niger* (Boel *et al.*, 1990); *Bacillus licheniformis* (Hwang *et al.*, 1997); *Bacillus subtilis* 168 (Fujimoto *et al.*, 1998), *Bacillus amyloliquefaciens* (Alikhajeh *et al.*, 2010) y *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148 (Koropatkin y Smith, 2010) entre otras. También se han secuenciado y en algunos casos obtenido estructuras tridimensionales de pululanastas, como las de *Thermotoga maritima* (Bibel *et al.*, 1998), *Klebsiella pneumoniae* (Mikami *et al.*, 2006); *Bacillus acidolpullulyticus* (Turkenburg *et al.*, 2009) y de *Thermotoga neapolitana* (Kang, 2011); y en menor medida de amilopululanastas, como las de *Pyrococcus woesei* (Knapp *et al.*, 1995), *Bacillus* spp. KSM-1378 (Hatada *et al.*, 1996) y *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E (Mathupala *et al.*, 1993).

Dentro de las amilasas producidas por bacterias ácido lácticas, no existen muchos reportes de secuenciación. Satoh *et al.* (1997) obtuvieron la secuencia de las amilasas producidas por *S. bovis* 148. Por otro lado, dentro del género *Lactobacillus* se ha predicho, a partir de los genes, la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -amilasas como las de *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus amylovorus* (Giraud y Cuny, 1997 y 1998; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005) y *Lactobacillus manihottivorans* LMG 18010 (Morlon-Guyot *et al.*, 2001; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005). Otras secuencias de amilasas de bacterias ácido lácticas amilolíticas se han identificado por secuenciación de genomas, incluidas las amilopululanastas de *S. bovis* JB1 (Benhamed *et al.*, 2014) y *L. plantarum* L137 (Kim *et al.*, 2008) sin haberse comprobado la síntesis de las mismas por el organismo productor.

Tomando como referencia a la Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae*, la primera  $\alpha$ -amilasa cuya estructura tridimensional fue descrita y reportada (Matsuura *et al.*, 1984), las  $\alpha$ -amilasas del clan GH-H poseen tres dominios característicos y conservados en su secuencia de aminoácidos: los dominios A, B y C. El dominio A contiene los residuos catalíticos y es el más conservado de todos. Tiene una estructura de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (o barril TIM) compuesto de ocho láminas  $\beta$ -plegadas paralelas rodeadas por 8 hélices  $\alpha$ . El dominio B está insertado entre la tercera lámina  $\beta$ -plegada y la tercera hélice  $\alpha$  del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, y varía en longitud y estructura (Taniguchi y Honnda, 2009; Sarian *et al.*, 2017). El dominio C se pliega en ocho hojas  $\beta$ -plegadas antiparalelas, está conectado al dominio A a través de bucles (loops), y parece ser un dominio independiente, pero hasta el momento no se ha descrito su función (Figura 8) (Sarian *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Estructura terciaria de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis*. El dominio A, en rojo, es un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. El dominio B está en color azul y el dominio C en color verde. La enzima tiene tres iones  $\text{Ca}^{2+}$ , que se muestran en color café, y un ión  $\text{Na}^{+}$  que se presenta en azul. Tomado de: Reza Nazmi *et al.* (2006).

Las enzimas de la familia GH13 comparten un sitio catalítico altamente conservado. Éste está localizado dentro de una cavidad abierta entre los dominios A y B e invariablemente contiene a la triada catalítica Asp206 (nucleófilo), Glu230 (donador de protones) y Asp297 (estabilizador del estado de transición), los cuales son esenciales para llevar a cabo la reacción enzimática. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  se localiza dentro de la cavidad catalítica y coordina con varios residuos aminoacídicos, estabilizando

la arquitectura de la cavidad, lo cual también es esencial para la catálisis (Taniguchi y Honnda, 2009; Sarian *et al.*, 2017). Aunado a los tres residuos de la triada catalítica, las enzimas de la familia GH13 contienen otros tres residuos altamente conservados: la Arg204 y dos residuos de histidina, His122 e His296. Estas cuatro regiones (triada catalítica, Arg204, His122 e His296) forman la base de las cuatro regiones conservadas más conocidas en las secuencias de las  $\alpha$ -amilasas, mismas que están posicionadas en el extremo carboxilo cerca de las láminas  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 y  $\beta$ 7 del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>; sin embargo, los dos residuos de histidina no están del todo conservados en la familia (Janeček, 2002). Aunadas a estas cuatro regiones, existen otras tres: la quinta está localizada en el extremo carboxilo terminal cerca del dominio B y del aspartato de unión a calcio: el Asp175 en la Taka-amilasa A. Las dos regiones restantes se encuentran en las láminas  $\beta$ 2 y  $\beta$ 8 del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Estas tres regiones pueden sufrir variaciones dependiendo de las características y especificidades de ciertas enzimas de la familia (Janeček 2002; Taniguchi y Honda, 2009).

Pese a la presencia de varias regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos, los aminoácidos estrictamente invariables son muy pocos, por tanto el criterio básico para que una proteína pueda clasificarse como miembro de la familia GH13 es: 1) la enzima debe atacar enlaces  $\alpha$ -glucosídicos; 2) hidrolizar o formar por transglicosilación enlaces  $\alpha$ -glucosídicos; 3) contener las cuatro regiones conservadas en su secuencia de aminoácidos y 4) contener la triada catalítica formada por Asp206, Glu230 y Asp297, propia de la Taka-amilasa A (la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*) (Janeček, 2002).

## **Dominios de unión al almidón**

Algunas de las glucósido-hidrolasas cuentan con dominios no catalíticos auxiliares en la unión de éstas al almidón insoluble y que se conocen como dominios de unión al almidón, o SBDs (por sus siglas en inglés). A su vez, los SBDs forman parte de los módulos de unión a carbohidratos (CBM, por sus siglas en inglés), los cuales inicialmente fueron denominados dominios de unión a celulosa, debido a que se describieron por primera vez en enzimas capaces de degradarla. Sin embargo, se fueron descubriendo cada vez más dominios presentes en enzimas activas sobre carbohidratos que eran capaces de unir otro tipo de polisacáridos además de la celulosa (Shoseyov *et al.*, 2006; García *et al.*, 2012).

Los módulos de unión a carbohidratos se definen como módulos auxiliares de 40 a 200 aminoácidos con un plegamiento discreto, con actividad de unión a carbohidratos y que se encuentran normalmente en enzimas con actividad sobre dichos sustratos. Estos módulos no tienen actividad catalítica y se sabe que tienen tres funciones principales: 1) permitir la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima en solución, 2) acercar el sustrato al sitio activo en el dominio catalítico promoviendo la hidrólisis, y 3) en algunos casos puede llegar a tener la capacidad de quebrantar la estructura del almidón con la finalidad de aumentar la hidrólisis. Los CBM se han clasificado en 83 familias de acuerdo con la similitud de su secuencia, según la base de datos CAZY ([www.cazy.org](http://www.cazy.org), última actualización 8 de agosto del 2018). Los SBDs pertenecen a las familias

CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48 y CBM53, CBM58, CBM68, CBM69, CBM74, CBM82 y CBM83 (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005; Guillén *et al.*, 2007; García, 2012; Janeček *et al.*, 2017).

Los SBDs son, entonces, un tipo de CBM que se unen específicamente a almidón. Están presentes en aproximadamente el 10% de las amilasas: se han encontrado en  $\alpha$ -amilasas de bacterias y hongos, en ciclodextrin-glucontransferasas, pululanasa y  $\beta$ -amilasas bacterianas y glucoamilasas fúngicas. Todas estas enzimas poseen características y especificidades distintas, pero todas son proteínas multi-dominio con secuencias de sus SBDs con cierta homología entre sí. Estos dominios pueden encontrarse antes o después del dominio catalítico acompañados de los llamados dominios de fibronectina tipo III, hallados en una gran variedad de enzimas activas sobre carbohidratos. En general, están compuestos por 100 residuos de aminoácidos, de los que destacan los residuos aromáticos en posiciones estratégicas, sobre todo residuos de triptófano, tirosinas, fenilalaninas e histidinas, los cuales se ha visto que son esenciales para la unión del almidón a la enzima. Los SBDs encontrados en el extremo amino terminal pertenecen a las familias CBM21, 34, 41, 45, 48, 53 y 68; mientras que los que se encuentran en el extremo carboxilo terminal son los de las familias CBM20, 25, 26, 69 y 74 (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005; Janeček *et al.*, 2017).

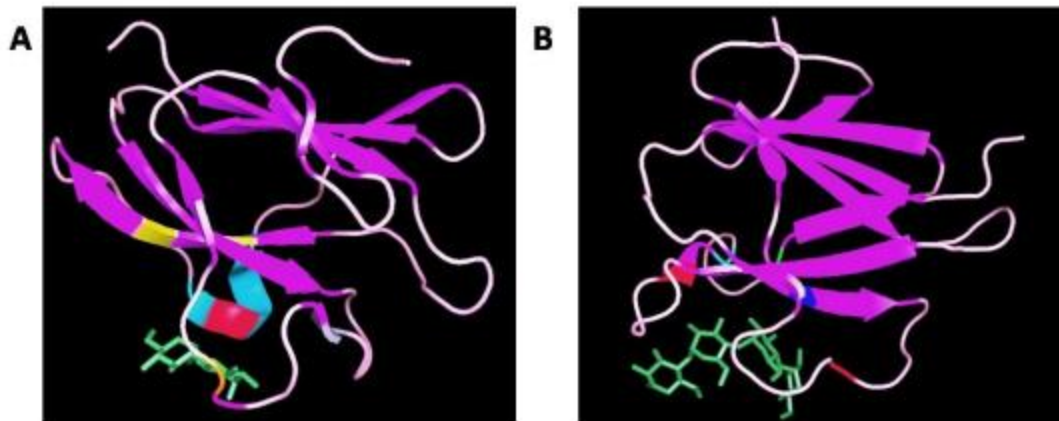
Los SBDs más estudiados son los que pertenecen a la familia CBM20. Estos módulos se localizan después del dominio catalítico o después de un largo anclaje O-glicosilado. Los dominios catalíticos de esta familia tienen actividad glicósido-hidrolasa y transferasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa, glucoamilasa y pululanasa. Los miembros del CBM20 se encuentran distribuidos entre las familias GH13, GH14 y GH15. Por otro lado, el CBM41 es propio principalmente de pululanasa bacterianas. Se ha visto que la pululanasa de *Thermatoga maritima*, Pul13, posee un SBD en el extremo amino terminal que puede unirse a amilosa, amilopectina, pululano y fragmentos de oligosacáridos derivados de estos polisacáridos (van Bueren *et al.*, 2004).

El plegamiento general de los SBDs es muy similar entre las familias CBM20, CBM41, CBM25 y CBM26, aunque exista poca similitud en la secuencia. Sin embargo, los SBDs de las familias CBM20, CBM48 y CBM69, muestran una alta similitud tanto en estructura como en secuencia; y el mismo caso se da con los SBDs de las familias CBM25 y CBM26. Sin embargo, no es así para el caso de los SBDs de la familia CBM41. El hecho de que esta familia de SBDs se encuentre preferiblemente en pululanasa podría explicarse por la capacidad de esta familia para alojar oligo o polisacáridos con glucosas enlazadas por enlaces  $\alpha(1-6)$ , habilidad de la que probablemente carecen las familias CBM20, CBM25, CBM26, CBM48 y CBM69 (Janeček *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, los efectos principales de los CBMs al unirse a polisacáridos son el acercamiento de éstos al dominio catalítico, destruir la estructura del sustrato y promover la hidrólisis. En la cuestión de la unión del polisacárido al sitio de unión del SBD, se reporta que se lleva a cabo por adsorción no covalente, vía puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre los residuos de aminoácidos y la superficie del gránulo de almidón. (Southall *et al.*, 1999; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005). En la cuestión del acercamiento del sustrato al dominio catalítico, el CBM mantiene a la enzima en contacto cercano con el sustrato, resultando en un



aumento en la concentración de la enzima en la superficie de aquél, lo que también aumenta la velocidad de degradación. Por otro lado, para que la destrucción de la estructura del almidón se lleve a cabo se requieren interacciones multivalentes, las cuales son inherentes en la mayoría de los SBDs de la familia CBM20.



**Figura 9.** Estructura tridimensional del SBD. Se muestra la estructura compartida del barril beta. A. CBM26; B, CBM25 de la amilasa de *Bacillus halodurans* obtenida por difracción de rayos X. Los SBDs se muestran interactuando con sus correspondientes carbohidratos (verde). Se marcan los aminoácidos esenciales para el sitio de unión a almidón: Trp, en rojo; Thr, en amarillo; Glu, en naranja; His, en azul. Tomado y modificado de García *et al.*, 2012.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

---

El maíz cuenta con una concentración natural de sacarosa (principal azúcar soluble en el grano) de 2% base seca en el grano entero; sin embargo, esta concentración se reduce hasta 0.1-0.7% después del proceso de nixtamalización. Por otro lado, el endospermo del grano de maíz posee alrededor de un 87% de almidón, por lo que al finalizar la nixtamalización éste es el principal carbohidrato disponible (FAO, 1993). Existe una alta proporción (40%, con respecto al total de las cuentas microbianas) de bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA) en la masa inicial de nixtamal, concentración que disminuye hasta el 3% después de 72 horas de fermentación, cuando son las bacterias ácido lácticas no amilolíticas las que predominan (Díaz-Ruiz *et al.* 2003a). Dada la drástica reducción en la concentración de mono y disacáridos en el nixtamal, la gran carga y diversidad microbiana que existe en el pozol no podrían desarrollarse consumiendo esta baja concentración de carohidratos sencillos. Esto condujo a plantear la hipótesis sobre la importancia de las BALAs para utilizar el almidón y dar inicio a la fermentación, con lo que se generarían azúcares más sencillos que servirían como sustrato para las bacterias ácido lácticas no amilolíticas que llevarían la fermentación a término (Díaz, 2003).

En el mismo trabajo, Díaz-Ruiz *et al.* (2003a) estudiaron la cepa de *S. infantarius* subsp. *infantarius* 25124 (*Sii*-25124) que se identificó en todas las etapas de la fermentación del pozol, sospechando su posible capacidad amilolítica. Los resultados que obtuvieron confirmaron dicha capacidad y sugirieron que la presencia de esta cepa podría ser la que provea de maltooligosacáridos de bajo peso molecular durante el inicio de la fermentación de la masa de nixtamal, de manera que otras especies no amilolíticas los consuman y lleven a término el proceso. Aunado a esto, también plantearon la probabilidad de que *S. infantarius* no sólo tuviera el rol de degradar el almidón inicial, sino que también podría estar creando las condiciones necesarias para que otros microorganismos se desarrollen, dando lugar a la diversidad microbiana ya reportada en este alimento (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a).

Posteriormente, en el trabajo de Virgilio (2005) se encontró que en extractos celulares de la cepa de *Sii*-25124 la actividad enzimática parecía estar asociada a la célula, confirmando los resultados previamente sugeridos por Díaz-Ruiz *et al.* (2003a); además, se observó que en los extractos la actividad óptima se presentó a pH 6.8 y a una temperatura de 37°C. Por otro lado, se hicieron zimogramas de los extractos, con los que se encontró que la posible responsable de la actividad amilolítica de la cepa sería una enzima con un tamaño aproximado de 250 kDa, con lo que se sugirió que podría tratarse de una amilasa diferente a las comúnmente reportadas para otras bacterias lácticas amilolíticas. Además, se encontró que la cepa de *S. infantarius* 25124 (*Sii*-25124) aislada en nuestro laboratorio posee características singulares, como lo son su tolerancia a estrés ambiental (Domínguez, comunicación personal), su capacidad xilanolítica (Cooper, comunicación personal) y su capacidad amilolítica (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a; Virgilio, 2005), mismas que se han abordado de forma particular en este grupo.

Dado el interés científico de conocer la ecología microbiana de este alimento, lo cual incluye el estudio de su microbiota, su proteómica, la evolución y la filogenia entre sus especies y sus enzimas, el estudio al que se enfocó este proyecto fue a la caracterización de la o las amilasas responsables de la actividad amilolítica de *Sii-25124*, así como la información que puede brindar con respecto a la conformación y la dinámica de la población microbiológica en el pozol. Asimismo, la investigación se plantea por el atractivo tecnológico que tienen las amilasas provenientes de BALAs en la aplicación a procesos industriales, como la obtención de ácido láctico, jarabes de maíz, la elaboración de pan y cervezas, o la producción de papel y detergentes.

## HIPÓTESIS

---

Dado que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124 (*Sii*-25124), bacteria láctica amilolítica, predomina en todas las etapas de la fermentación del pozol y que el almidón es el carbohidrato mayoritario en la fase inicial de la fermentación del producto, se espera entonces encontrar y conocer una o más amilasas producidas por *Sii*-25124 con actividad amilolítica sobre polisacáridos ramificados y no ramificados.

## OBJETIVOS

---

Caracterizar la actividad amilolítica de la cepa de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124 aislada del pozol.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Determinar las mejores condiciones para la extracción, separación y concentración de las amilasas producidas por *Sii*-25124.
- Encontrar una vía de purificación que permita obtener la secuencia de las amilasas producidas, con el fin de corroborar su identidad mediante su comparación con bases de datos especializadas.
- Caracterizar la actividad amilolítica de dichas enzimas estudiando:
  - Su unión a almidón insoluble como una prueba de la existencia de módulos de unión a carbohidratos y una posible vía de purificación.
  - Su comportamiento frente a cambios de temperatura y pH.
  - El efecto de iones metálicos.
  - Su actividad frente a almidón y amilopectina como sustratos.
- Sugerir el posible papel de *Sii*-25124 como bacteria amilolítica en el pozol, que justifique su presencia en todas las etapas de la fermentación.

# METODOLOGÍA

## EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LAS AMILASAS DE *Sii-25124*.

---

### **Reactivación de bacterias y obtención de cultivos frescos de *Sii-25124***

Las células de *Sii-25124* se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para reactivarlas se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de células conservadas en caldo DeMan-Rogosa-Sharpe-Almidón con 20% de glicerol (MRS-A-Glicerol) y se llevaron a 5 mL de caldo DeMan-Rogosa-Sharpe-Almidón (MRS-A) (Anexo I). Las células crecieron por 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  y entonces se tomó un inóculo del 20% con respecto al volumen requerido para obtener un pre-cultivo, el cual se incubó durante 18 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Después, a partir de este pre-cultivo se inoculó al 50% en caldo MRS-A con respecto al volumen de cultivo final que se necesitara obtener, ya fueran 30, 50 ó 500 mL, y finalmente se incubó 6 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  para obtener dicho cultivo final. Este cultivo fresco fue el que se utilizó para los experimentos subsecuentes que se describen a continuación.

### **Ensayo de actividad enzimática**

Con el fin de cuantificar la actividad amilolítica de *Sii-25124*, se utilizó el método de extinción del complejo almidón-yodo según lo descrito por Giraud *et al.* (1993), para lo cual se preparó una solución de almidón soluble de papa (Panreac) de 12.5 mg/mL disuelto en buffer de fosfatos (fosfato de sodio dibásico hepta-hidratado y fosfato de sodio monobásico de J.T. Baker) 0.1 M pH 6.8. Para el ensayo, se colocaron 0.8 mL de dicha solución en microtubos, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y se colocaron 0.1 mL de la muestra con la actividad amilolítica de *Sii-25124*, con 50 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Mallinckrodt AR). En seguida se colocaron 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (J.T. Baker) 2 N para detener la reacción; el tubo con esta mezcla de reacción se colocó inmediatamente en hielo y se consideró el tiempo cero ( $t_0$ ) de reacción. Después, se agregaron 0.1 mL de la misma muestra con la actividad amilolítica de *Sii-25124* con 50 mM de  $\text{MgCl}_2$  a un segundo tubo con 0.8 mL de solución de almidón a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se dejó correr la reacción durante 10 minutos, para después detenerla agregando 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N y colocar en hielo. Este tubo correspondió al tiempo 10 ( $t_{10}$ ) de la reacción. Finalmente, la degradación del almidón se midió colorimétricamente agregando 0.1 mL de la mezcla de reacción a 2.5 mL de una solución de  $\text{I}_2\text{-I}^-$  (Yodo sublimado ( $\text{I}_2$ ) y KI de J.T. Baker) al 4% y se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis.

La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad amilolítica por mililitro de muestra (U/mL), misma que se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Anexo II).

## **Extracción enzimático-mecánica de la amilasa de *Sii-25124***

Se utilizó un método que permitiera degradar pared celular y posteriormente romper la membrana plasmática, con el fin de que el contenido membranal y citoplásmico fuera liberado. Los tratamientos más socorridos para estos fines son los tratamientos con lisozima para obtener protoplastos por destrucción de la pared celular, y la lisis celular por sonicación para liberar el contenido de membrana y citoplasma. Por tanto, se decidió primero evaluar distintos buffers para determinar cuál de ellos permitía una extracción más eficiente vía la obtención de protoplastos, para después usar el mejor de ellos para someter a las células a una sonda de ultrasonido.

## **Efecto de distintos buffers en la eficiencia de extracción de la amilasa de *Sii-25124***

La primera evaluación fue el tratamiento con lisozima para destruir la pared celular de las células. Para ello, primero se hicieron ensayos con diversos buffers con el fin de averiguar cuál de ellos era más compatible con la actividad amilolítica de *Sii-25124* para que la extracción de la enzima fuera lo más completa y eficiente posible. Se usaron los siguientes buffers: Tris-HCl-EDTA (TE) (Tris-HCl 1 M, Trizma base de Sigma y HCl de J.T. Baker; EDTA 0.5 M de J.T. Baker) pH 8.0, Tris-HCl 50 mM (Trizma base de Sigma; HCl de J.T. Baker) pH 8.0, MOPS (ácido 4-morfolinpropanosulfónico 40 mM de Sigma-Aldrich; Acetato de sodio 10 mM de J.T. Baker; EDTA pH 1 mM de J.T. Baker) pH 8.0, buffer de fosfatos 0.1 M (Fosfato de sodio dibásico hepta-hidratado y fosfato de sodio monobásico de J.T. Baker) pH 8.0 y Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Trizma base de Sigma 0.4 M; Ácido acético glacial, 1 M y EDTA 0.01 M de J.T. Baker) pH 8.0.

Para el procedimiento se partió de 5 cultivos de 50 mL de *Sii-25124*, según lo descrito. Para cosechar las células de cada uno de los 50 mL de cultivo de *Sii-25124*, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, el botón celular se lavó resuspendiendo en 5 mL de cada buffer a evaluar y centrifugando a 10,000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Después, cada uno de los botones celulares se resuspendió en 2.5 mL del buffer a evaluar y en seguida se agregó a cada uno 3 mL del buffer con 12 mg de lisozima de huevo de gallina (Sigma). Se incubaron a 37°C durante una hora y finalmente se recuperaron los sobrenadantes y los botones de protoplastos, centrifugando a 10,000 rpm y 4°C por 15 minutos con el fin de medir la actividad amilolítica en cada una de las fases.

## **Extracción de la amilasa de *Sii-25124* por lisis celular**

Después de encontrar el mejor buffer para la obtención de protoplastos de *Sii-25124* con actividad amilolítica, se usó un método mecánico para romperlos y extraer la enzima. Para ello, se obtuvieron cultivos de 50 mL con 6 horas de crecimiento. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos para eliminar el sobrenadante y resuspender las células en buffer Tris-EDTA pH 8.0 (Tris-HCl 1 M; EDTA 0.5 M), sacarosa (Difco™) 25% y lisozima 4 mg/mL (buffer TE-Sacarosa-Lisozima), y se incubó durante 1 hora a 37 °C para obtener protoplastos de *Sii-25124*. Transcurrido el tiempo, la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm, 4°C por 15 minutos para separar el buffer y los protoplastos; estos últimos se resuspendieron en buffer de lisis (EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, buffer de fosfatos pH 6.8 0.1 M), se agregó una mezcla inhibidora de proteasas (Complete Mini EDTA free

de Roche Diagnostics) 1/100 (v/v)) y se sometió a una sonda de ultrasonido Sonics Vibra Cell VCX 500 con la que se dieron 5 ciclos, cada uno con 20 segundos de pulsaciones al 20% de amplitud y 20 segundos de enfriamiento. Después, se recuperó el sobrenadante del lisado y el botón celular centrifugando a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, para realizar un ensayo enzimático en ambas fracciones.

### **Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida**

Con el fin de evaluar qué tan eficiente fue la extracción de la amilasa de *Sii-25124* en la fracción soluble del lisado celular, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970) (Anexo III). Para ello se prepararon geles de 1 mm de espesor al 8.0% de una solución de acrilamida/bis-acrilamida (acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida de Sigma), llevando a cabo la migración a 90 V durante 120 minutos. La tinción para observar la presencia de proteínas se realizó con azul de Coomassie (Imperial Blue Protein Stain de Thermo Scientific); mientras que para detectar la actividad amilolítica en los geles se realizó un zimograma, usando el método de extinción del complejo almidón-yodo (Boettcher y de la Lande, 1968) (Anexo IV).

### **Ensayos de separación y concentración de la amilasa de *Sii-25124***

#### **Precipitación fraccionada de las proteínas del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25134* con sulfato de amonio**

A partir de dos matraces con 500 mL de cultivo fresco con 6 horas de crecimiento se obtuvieron 100 mL del sobrenadante del lisado en fracciones de 10 mL. En seguida se agregó, con agitación suave y constante a 4°C, 16.6 g de sulfato de amonio (J.T. Baker) para llevar a una concentración de saturación 30% de esta sal y obtener una primera fracción de proteínas, la cual se centrifugó a 11,300 rpm durante 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido se recuperó y el sobrenadante se sometió a un segundo fraccionamiento que se llevó de 30% a 60% de saturación de sulfato de amonio, agregando 18.4 g de la sal. La mezcla se centrifugó nuevamente a 11,300 rpm por 15 minutos a 4°C para recuperar el pellet y someter al sobrenadante a un último fraccionamiento, que se llevó de 60% a 100% de saturación de sulfato de amonio, para lo cual se agregaron 28.3 g. Se centrifugó una vez más a las mismas condiciones, se recuperaron pellet y sobrenadante.

Las tres fracciones obtenidas (0-30%, 30-60% y 60-100%) se sometieron a diálisis, para lo cual se ocupó una membrana 7 Spectra/Por con un corte molecular de 50 kDa. Cada fracción se resuspendió en el menor volumen posible de buffer Tris-EDTA (Tris-HCl 1 M; EDTA 0.5 M) (5 mL) y se dializaron contra el mismo buffer Tris-EDTA durante 24 horas a 7°C, haciendo cambios de buffer cada 4 horas. Al término de la diálisis se recuperaron las fracciones de proteína con un volumen final de 10 mL y cada una se sometió a un ensayo de actividad amilolítica *in vitro*, a una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y a un zimograma.

## **Separación y concentración de la amilasa de *Sii-25124* usando dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter**

A partir de 500 mL de cultivo fresco de *Sii-25124* se obtuvieron 25 mL del sobrenadante del lisado celular. De este sobrenadante se tomaron 4 mL y se colocaron en un tubo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device de Merck Millipore con una membrana PLFK Ultracel-PL con corte molecular de 100 kDa. El dispositivo con la muestra se centrifugó a 5,000 g durante 75 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose 500  $\mu$ L finales de concentrado. A continuación, tanto la fracción retenida en la membrana (concentrado) como la fracción que pasó por la membrana (filtrado) se sometieron a un ensayo enzimático *in vitro*, a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y a un zimograma.

## **Concentración de la amilasa de *Sii-25124* por lisis celular**

Con la finalidad de obtener un lisado celular más concentrado para llevar a cabo los experimentos subsecuentes, se procedió a obtener 50, 250 ó 500 mL de cultivo. Se obtuvieron protoplastos de cada cultivo y cada uno de los botones de protoplastos obtenidos se resuspendieron en 10 mL de buffer de lisis, obteniéndose así diferentes concentraciones: 10x, 25x o 50x. Se sometieron a sonicación y se realizó un ensayo *in vitro* de actividad amilolítica de cada uno, así como a un SDS-PAGE y un zimograma para corroborar la concentración de la actividad amilolítica.

## **SECUENCIACIÓN DE LAS AMILASAS PRODUCIDAS POR *Sii-25124***

---

Se llevó a cabo un ensayo de purificación por unión al almidón insoluble (Guillén *et al.*, 2007) a partir de 3 L de cultivo. Para ello se partió de 6 cultivos de 500 mL de *Sii-25124*. Se cosecharon las células de cada cultivo y se obtuvieron los lisados celulares de cada cultivo (uno por cultivo: es decir, seis). Posteriormente, a cada uno se le agregó Tritón X-100 de Sigma al 1%, y se incubaron en agitación constante a 100 rpm y 4°C durante 30 minutos. Se obtuvieron los sobrenadantes de los lisados celulares de cada cultivo (6).

Los sobrenadantes (6) se recolectaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, dando un total de 30 mL de sobrenadante. Se tomaron 2 mL de este sobrenadante y se usaron para resuspender 500 mg de almidón insoluble de Sigma-Aldrich, el cual fue previamente lavado según la metodología de Guillén *et al.* (2007). Una vez resuspendido el almidón, se colocó con el resto del sobrenadante celular y se incubó durante 4 horas a 4°C con agitación constante a 100 rpm.

Transcurridas las 4 horas, se centrifugó la suspensión almidón-lisado a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recuperaron ambas fracciones. La fracción soluble se colectó en un tubo Falcon de 50 mL, mientras se continuó trabajando con el pellet de almidón-proteína. Éste se sometió a cuatro lavados con 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8, agitando a 300 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos, para luego centrifugar a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 8 minutos. La fracción soluble obtenida después de cada lavado se desechó una vez



descartada la presencia de actividad amilolítica en ellas. Las fracciones obtenidas después del ensayo se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, para después teñir con Coomassie y realizar un zimograma.

Las bandas a secuenciar se cortaron directamente del zimograma usando pinzas y bisturí estériles, colocando el zimograma sobre cajas Petri de vidrio con 2 mL de agua MiliQ. Una vez cortadas las bandas, cada una se colocó en un microtubo nuevo y estéril, agregando 10 µL de agua MiliQ. Se centrifugó a 500 rpm en una centrifuga Eppendorff 5417 R durante 30 segundos a 4°C para bajar los cortes al fondo de los tubos y se almacenaron a -90° C hasta el día de su procesamiento. Las bandas cortadas se nombraron Amy4 y Amy3, siendo Amy4 la banda de mayor masa molecular (aproximadamente 250 kDa) y Amy3 la banda de menor masa molecular (aproximadamente 50 kDa).

Las bandas fueron enviadas al Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal (IRC-Montreal) para ser secuenciadas. Para ello, las proteínas de cada banda se digirieron con tripsina y después se sometieron a una cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas en tándem (LC-MS/MS), según el protocolo descrito por Cárdenas *et al.* (2014). Una vez identificados los péptidos secuenciados, se realizó una comparación de su secuencia con la base de datos de proteínas bacterianas del NCBI (Centro Nacional para la Información Bioinformática), vía una búsqueda de alineamientos básicos locales de secuencias usando la herramienta BLAST provista por la página de la misma institución (National Center of Biotechnology Information, 2018).

## CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE LAS AMILASAS DE *Sii-25124*

---

### **Ensayos de unión a almidón insoluble de las amilasas de *Sii-25124***

Para los ensayos se partió de 6 cultivos de 500 mL de *Sii-25124* como se describió anteriormente. Una vez obtenido el pellet de almidón-proteína se eluyó usando una solución de beta-ciclodextrina 9 mg/mL (Sigma) en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8. Se realizaron tres eluciones, para cada una se usó 1 mL de la solución de beta-ciclodextrina, se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y finalmente se recuperó la fracción soluble centrifugando a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada elución se colocó en una membrana de diálisis con corte molecular de 50 kDa Spectra/Por de Spectrum Laboratories, y se dializaron contra buffer de fosfatos (0.1 M pH 6.8) a temperatura ambiente con agitación constante durante 24 horas con recambios de buffer cada 3 horas. Finalmente se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, en la cual se cargaron cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación. Se obtuvieron 2 geles: uno de ellos se tiñó con azul de Coomassie y el otro se usó para un zimograma.

## **Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las amilasas de *Sii-25124***

Se obtuvo un lisado celular de *Sii-25124* de 250 mL y a partir de éste se obtuvo el sobrenadante del lisado celular, el cual se distribuyó en microtubos colocando en cada uno 1 mL del mismo. Una serie de tubos se sometió a 8 temperaturas diferentes durante 10 minutos; mientras que otra serie se sometió a las mismas 8 temperaturas durante 1 hora. Las temperaturas evaluadas fueron: 15°, 25°, 30°, 37°, 45°, 50°, 55° y 60°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir la actividad amilolítica a 37°C, pH 6.8 y con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las mediciones se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes y se utilizó como control el sobrenadante del lisado recién obtenido sin incubación previa a ninguna temperatura, midiendo su actividad a 37°C, pH 6.8 y con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.

## **Efecto del pH sobre la estabilidad de las amilasas de *Sii-25124***

Se obtuvo el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* se distribuyó en microtubos colocando 0.5 mL del sobrenadante del lisado en cada tubo. A continuación se colocaron 0.5 mL de buffer a los diferentes valores de pH a ensayar. Se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los valores de pH ensayados fueron: 3.0, 4.0, 5.0 y 5.5 con buffer de fosfatos-citratos 0.1 M (fosfato de sodio dibásico hepta-hidratado y ácido cítrico monohidratado granular de J.T. Baker); 6.0, 6.8, 7.0, 7.5 y 8.0 con buffer de fosfatos 0.1 M; y pH 9.0 con buffer Tris-HCl 0.1 M. Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó el ensayo de actividad amilolítica *in vitro* a pH 6.8 y 37°C, agregando MgCl<sub>2</sub> 10 mM a cada tubo con enzima+buffer. Como control se consideró la actividad amilolítica a 37°C en presencia de magnesio del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* recién obtenido y sin previa incubación a pH o temperatura.

## **Efecto de iones metálicos sobre la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*.**

Se obtuvo el sobrenadante del lisado celular de un cultivo de *Sii-25124* para distribuirlo en 10 tubos Eppendorff de 1.5 mL. Los iones a evaluar fueron Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y Zn<sup>2+</sup> (en forma de cloruros de J.T. Baker). De cada uno se agregó un volumen tal que resultara en una concentración de 10 mM en 1 mL de sobrenadante de lisado celular. Después, cada tubo con sobrenadante y ión metálico a evaluar se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizó el ensayo de actividad amilolítica *in vitro*. Como control se usó el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* sin haber incubando con ningún ión, midiendo su actividad a pH 6-8 y 37°C.

## **Efecto del sustrato en la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124***

Con el fin de observar el comportamiento de las amilasas de *Sii-25124* frente al almidón, se realizaron curvas de desaparición de sustrato con respecto al tiempo y de aparición de producto con respecto al tiempo.

### **Curso temporal de la hidrólisis del almidón**

Para este experimento se realizó un ensayo discontinuo, usando diferentes microtubos con 0.08 mL de almidón soluble (125 mg/mL) en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8. A cada tubo le correspondió un tiempo determinado: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos. Los tubos se colocaron en un Termomixer Eppendorff a 37°C y 350 rpm. Al tubo 0 se le agregó 0.01 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y posteriormente se agregaron 0.01 mL de un sobrenadante de lisado celular de *Sii-25124* proveniente de 250 mL de cultivo y se agregó cloruro de magnesio 10 mM. El tubo 0 se retiró inmediatamente y se colocó en hielo. El tubo 5 se dejó incubando durante 5 minutos tras agregar el sobrenadante del lisado y luego la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y se colocó en hielo; el tubo 10 se dejó incubando 10 minutos para luego parar la reacción como se mencionó y así sucesivamente.

Una vez logrados todos los tiempos de la curva, se realizó una dilución 1/25 de cada una de ellas, para luego realizar la reacción colorimétrica con yodo-yoduro.

### **Curso temporal de la producción de azúcares reductores a partir de almidón**

Para este experimento se utilizó un sobrenadante de lisado celular de *Sii-25124* obtenido a partir de 250 mL de cultivo. El sobrenadante del lisado resultante se dializó usando una membrana de corte molecular de 50 kDa Spectra/Por de Spectrum Laboratories contra 1 L de buffer de fosfatos (0.1 M pH 6.8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) a temperatura ambiente, con agitación constante, durante 24 horas y con recambios cada 3 horas.

Se hizo un ensayo discontinuo usando microtubos con 0.08 mL de almidón, 125 mg/mL, en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8. A cada tubo se le asignó un tiempo de incubación: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90 minutos. Todos los tubos se incubaron a 37°C y 350 rpm. Al tubo 0 se le agregaron 0.01 mL de NaOH (Mallinckrodt AR) 1 M y en seguida se agregaron 0.01 mL del sobrenadante del lisado celular dializado. Inmediatamente se colocó en hielo. Al tubo de 5 minutos se le agregaron 0.01 mL de sobrenadante dializado y se dejó incubando 5 minutos, agregando 0.01 mL de NaOH 1 M para detener la reacción. Al tubo de tiempo 10 se le agregó la misma cantidad de sobrenadante, se dejó incubando 10 minutos y se paró la reacción como se mencionó. Y de la misma forma se hizo con el resto de los tubos para cada uno de los tiempos de incubación.

Al finalizar el ensayo se realizó una dilución 1/25 usando agua destilada. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de cada dilución y se realizó una determinación de azúcares reductores por el método de DNS (Anexo V), (Miller, 1959).

### **Efecto de diferentes concentraciones de sustrato sobre la actividad de las amilasas de *Sii-25124***

Estos experimentos también se realizaron de forma discontinua. Para evaluar el efecto de la concentración de almidón sobre el sobrenadante del lisado de *Sii-25124* se probaron las siguientes concentraciones de almidón (Panreac): 375, 250, 125, 112.5, 100, 93.75, 62.5, 31.25, 12.5, 9.375,

6.25, 3.125 y 1.25 mg/mL. Para llevar a cabo las curvas, se obtuvo un sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* a partir de 250 mL de cultivo. Los tiempos a evaluar fueron 0, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos.

Para evaluar el comportamiento de las amilasas de *Sii-25124* frente a la presencia de 20.83 mg/mL, 31.25 mg/mL, 62.5 mg/mL y 100 mg/mL de amilopectina de almidón de maíz, en 19 microtubos se colocaron 0.08 mL de amilopectina de maíz de Sigma-Aldrich a las concentraciones evaluadas, 0.01 mL de sobrenadante de lisado celular y 0.01 mL de NaOH para detener la reacción. Después se midió la concentración de los azúcares reductores generados por el método de DNS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LAS AMILASAS DE *Sii-25124*

#### Extracción enzimático-mecánica de la amilasa de *Sii-25124*

##### Efecto de distintos buffers en la eficiencia de extracción de la amilasa de *Sii-25124*.

Para realizar la extracción enzimático-mecánica se buscó el mejor buffer para extraer la actividad amilolítica al medio de disolución (al buffer). En la Tabla 4 se muestran los resultados de la actividad amilolítica recuperada en las diferentes fracciones (suspensión celular inicial, botón celular y fracción soluble), con los diferentes buffers evaluados. Como se puede observar, la mejor liberación se obtuvo usando el buffer Tris-EDTA pH 8.0, ya que se obtuvo 71.6% de la actividad total de la suspensión celular inicial; mientras que en la fracción de los restos celulares se obtuvo un 48.7% de la actividad. Nótese que debido a la desviación estándar obtenida en los valores de la actividad amilolítica recuperada, la suma del porcentaje recuperado no corresponde al 100%. Por otro lado, la recuperación lograda con el resto de los buffers no superó en ningún caso el 20% de la actividad inicial: 9.36% para buffer de fosfatos, 16.16% para buffer TAE, 13.65% para buffer Tris-HCl y 8.1% para buffer MOPS.

**Tabla 4.** Resultados de la evaluación del mejor buffer a usar para la extracción de la amilasa de *Sii-25124*.

	Buffers evaluados				
	Fosfatos pH 8.0	TE pH 8.0	TAE pH 8.0	Tris-HCl pH 8.0	MOPS pH 8.0
<b>Suspensión celular inicial de <i>Sii-25124</i></b>					
Vol. tot. de la fracción (mL)	5	5	5	5	5
Promedio de Actividad amilolítica (U/mL)	7.8±2.2	5.2±0.3	3.1±1.8	7.3±1.2	5.9±0.9
Actividad total (U)	39	26	15.5	36.5	29.5
Porcentaje recuperado	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Fracción soluble</b>					
Vol. tot. de la fracción (mL)	5	5	5	5	5
Promedio de Actividad amilolítica (U/mL)	0.7±0.5	<b>3.7±1.6</b>	0.5±0.5	1.0±0.3	0.5±0.3
Actividad total (U)	3.5	<b>18.5</b>	2.5	5.0	2.5
Porcentaje recuperado	8.9%	<b>66.1%</b>	16.1%	13.6%	8.5%
<b>Restos celulares de <i>Sii-25124</i></b>					
Vol. tot. de la fracción (mL)	5	5	5	5	5
Promedio de Actividad amilolítica (U/mL)	3.6±0.5	2.5±1.1	0.9±0.4	6.4±0.5	1.5±0.03
Actividad total (U)	18	12.5	4.5	32	7.5
Porcentaje recuperado	46.1%	48.1%	29%	87.7%	25.4%

### Extracción de la amilasa de *Sii-25124* por lisis celular.

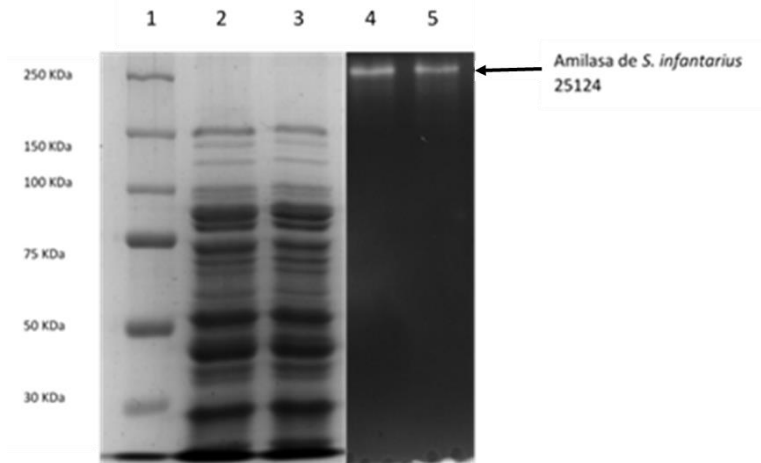
Con los resultados de la sección anterior se aplicó la liberación enzimático-mecánica, en la que se usó el buffer TE-sacarosa-lisozima. En la Tabla 5 se muestran los resultados de la extracción enzimática tras aplicar el método enzimático-mecánico con lisozima y una sonda de ultrasonido.

Al inicio, las células de *Sii-25124* mostraron una actividad de  $9.4 \pm 0.6$  U/mL (100%). Después, el tratamiento con lisozima degradó la pared celular de las células de *Sii-25124*, generando protoplastos que arrojaron una actividad del 87.1% con respecto al total inicial. La fracción soluble obtenida tras la obtención de protoplastos (recuperados por centrifugación), no presentó actividad amilolítica (datos no reportados), lo que sugiere que dicha actividad se encuentra asociada a membrana y no a pared celular (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a). Finalmente, la aplicación de la sonda de ultrasonido dio como resultado una actividad del 94.7% del total inicial en el sobrenadante del lisado celular y de 10.6% en el botón celular (fracción insoluble).

**Tabla 5.** Recuperación de actividad amilolítica en cada fracción obtenida por el método enzimático-mecánico.

Fracción	Volumen total de la fracción (mL)	Actividad amilolítica (U/mL)	Actividad total (U)	Recuperación de actividad (%)
Cultivo	50	---	---	---
Células	5	$9.4 \pm 0.6$	47	100
Protoplastos	5	$8.2 \pm 0.4$	41	87.2
Sobrenadante del lisado	5	$8.9 \pm 0.5$	44.5	94.7
Botón celular	5	$1.0 \pm 1.4$	5	10.6

En la Figura 10 se muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes del sobrenadante del lisado celular obtenido tras el proceso de sonicación, así como el zimograma del mismo. En el zimograma se observa la actividad amilolítica correspondiente a una banda de alta masa molecular, aproximadamente 250 kDa, lo cual coincide con reportes anteriores sobre la actividad amilolítica de *Sii-25124* (Díaz-Ruiz, 2003; Virgilio, 2005). Sin embargo, cuando el gel resultante del SDS-PAGE se tiñó con azul de Coomassie, no se logró visualizar una proteína que correspondiera en peso a la actividad observada en el zimograma. Por tanto, los ensayos subsiguientes se enfocaron en concentrar la enzima responsable de la actividad con el fin de visualizarla y poder realizar experimentos de caracterización.



**Figura VIII.1.** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* obtenido por la extracción enzimática-mecánica; tinción con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2 y 3 (duplicado): bandas correspondientes al conjunto de diferentes proteínas que están presentes en la fracción soluble del lisado celular de *Sii- 25124*; carriles 4 y 5 (duplicado): banda con actividad amilolítica que se observa en la zona superior cercana a los 250 kDa.

## Ensayos de separación y concentración de la amilasa de *Sii-25124*

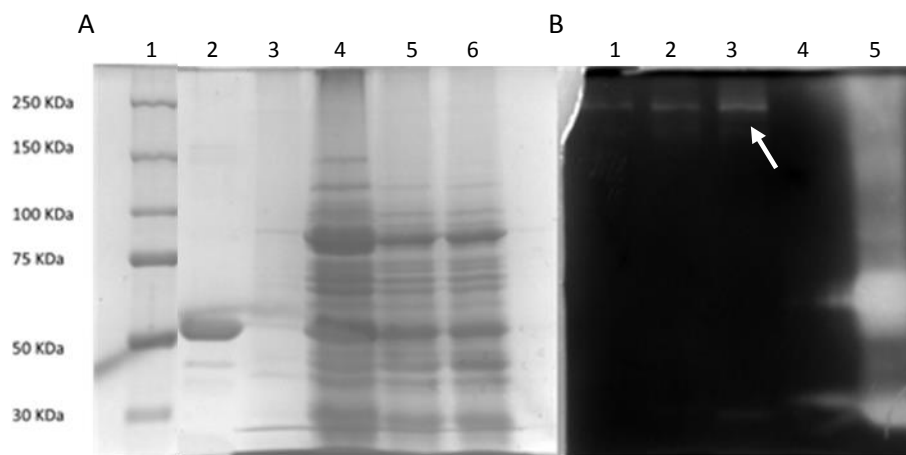
### Precipitación fraccionada de las proteínas del sobrenadante del lisado ceular de *Sii-25124* con sulfato de amonio.

La fracción soluble del lisado celular de *Sii-25124* fue precipitada con concentraciones crecientes de sulfato de amonio, utilizando concentraciones de saturación de 30, 60 y 100%, con el fin de encontrar el intervalo en el que la actividad amilolítica se enriqueciera, para después resuspender esta fracción en volúmenes pequeños, concentrar a la amilasa y posteriormente retirar el sulfato de amonio por diálisis para poder cuantificar la actividad amilolítica recuperada. Con el primer fraccionamiento con sulfato de amonio no precipitó proteína y después del fraccionamiento al 100% de saturación no se enriqueció lo suficiente (0.7 veces de enriquecimiento). El fraccionamiento a 60% de saturación de sulfato de amonio fue el único que mostró un enriquecimiento mayor (1.18); sin embargo, fue más bajo que el obtenido con el sobrenadante del lisado celular (Tabla 6).

**Tabla 6.** Enriquecimiento de las amilasas de *Sii-25124* usando precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Paso de enriquecimiento	Actividad (U/mL)	Volumen total de la fracción (mL)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Rendimiento %	Enriquecimiento
Células	10.7±0.1	100	1,072	1128±41.6	0.9	100	1
Protoplastos	13.1±3.2	50	656.5	527±24.4	1.24	61.2	1.3
Sobrenadante del lisado celular	12.1±2.1	100	1,211	865.5±38.7	1.39	112.9	1.4
Botón celular	1.1±0.2	50	53	416±16	0.12	4.92	0.1
Fracción 0%-30%	0	10	---	--	---	---	---
Fracción 30%-60%	18.7±2.1	10	186.7	166.5±13.1	1.12	17.7	1.2
Fracción 60%-100%	2.9±1.4	10	29.2	43.8±2.3	0.67	2.7	0.7

La diálisis realizada para eliminar el sulfato de amonio y poder cuantificar la actividad amilolítica de las fracciones pudo suponer un paso crítico para la integridad de la amilasa de *Sii-25124*. Se ha reportado que durante la diálisis puede ocurrir la agregación de proteínas si no se siguen las condiciones adecuadas, siendo las más críticas el tipo de buffer utilizado y la temperatura (Pesarrodonna *et al.*, 2015). El gel obtenido de este ensayo se muestra en la Figura 11. En él se puede observar que no fue posible visualizar la proteína correspondiente con la banda de actividad del zimograma, indicando que no se logró concentrar la proteína. Aunado a esto, en las bandas del zimograma se puede apreciar que la banda de actividad correspondiente a la fracción precipitada del dializado es un poco más intensa que la banda de actividad de la fracción soluble del dializado, lo que podría indicar que la mayor parte de la amilasa precipitó y no pudo recuperarse en la fracción soluble a una concentración suficiente para visualizarla por la tinción de Coomassie. Por otro lado, también pudieron generarse pérdidas de proteína por adsorción de ésta a la superficie de la membrana de diálisis (Pohl, 1990). Este fenómeno también pudo ser el causante de que las proteínas de menos de 50 kDa no se eliminaran de la muestra dializada y se siguieran visualizando en el gel teñido con Coomassie. Esto era algo esperado debido al corte molecular de la membrana que se utilizó para la diálisis



**Figura 11.** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. **A:** SDS-PAGE, tinción con azul de



Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich) como control positivo; carril 3: fracción soluble de la muestra precipitada al 60% de saturación de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 4: fracción insoluble de la muestra precipitada al 60% de saturación de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carriles 5 y 6 (duplicado): sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. **B:** zimograma de actividad amilolítica usando la técnica de extinción del complejo almidón-yodo. La flecha blanca indica la banda de actividad amilolítica de interés. Carriles 1 y 2: (duplicado) sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*; carril 3: fracción insoluble de la muestra precipitada al 60% de saturación de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 4: fracción soluble de la muestra precipitada al 60% de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 5: amilasa de *Bacillus licheniformis* como control positivo.

### Separación y concentración de la amilasa de *Sii-25124* usando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter.

Con el fin de concentrar y separar la amilasa de *Sii-25124*, se usó el dispositivo de concentración Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter de Merck Millipore con una membrana de corte molecular de 100 kDa. Dado el patrón de bandas de proteínas presentes en el lisado celular, en el que la mayoría eran de menos de 100 kDa (Figura 10), se esperaba eliminar éstas quedando presentes únicamente la banda de aproximadamente 100 kDa y la banda de 250 kDa correspondiente a la amilasa de *Sii-25124* de 250 kDa que se visualizó en los zimogramas de los ensayos anteriores.

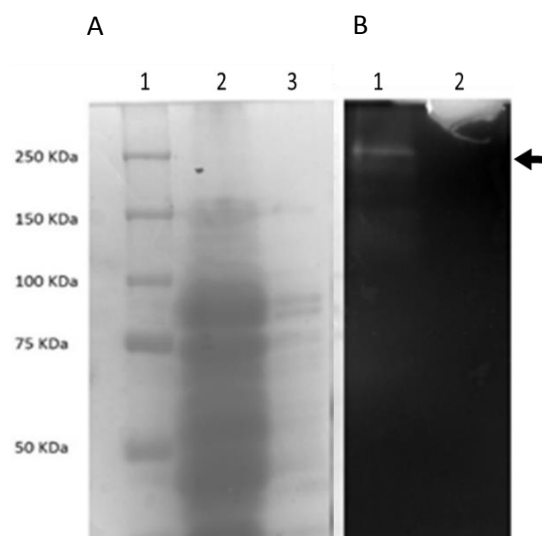
**Tabla 7.** Enriquecimiento de las amilasas de *Sii-25124* utilizando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter de Merck Millipore.

Paso de purificación	Actividad (U/mL)	Volumen total de la fracción (mL)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Rendimiento %	Enriquecimiento
Células	10.5±3.3	25	264.75	201.1±17.3	1.3	100	1
Protoplastos	13.3±0.3	25	334.5	193.3±29.3	1.7	126.3	1.3
Sobrenadante del lisado celular	13.3±1.4	25	332.5	156.1±14.7	2.1	125.5	1.6
Botón celular	5.2±0.3	25	131.25	133±21.9	1.0	49.5	0.74
Sobrenadante del lisado celular concentrado	<b>18.9±3.5</b>	0.5	<b>9.46</b>	1.2±0.2	<b>7.8</b>	3.57	<b>6.0</b>
Sobrenadante del lisado celular filtrado	<b>7.5±1.9</b>	5	<b>37.5</b>	2.2±0.2	<b>16.8</b>	14	<b>12.8</b>

En la Tabla 7 se presentan los resultados del experimento. Se puede observar una buena recuperación de la actividad amilolítica en el sobrenadante del lisado celular obteniéndose 13.3±1.4 U/mL, lo que se tradujo en un enriquecimiento de 1.6 veces. Después, el sobrenadante del lisado tratado con el dispositivo se concentró recuperando 18.9±3.5 U/mL de actividad amilolítica, siendo un enriquecimiento de 5.96 veces. Sin embargo, el filtrado también presentó actividad amilolítica considerable de 7.5±1.9 U/mL, lo que podría indicar degradación de la enzima de mayor peso o la presencia de una segunda enzima de bajo peso molecular responsable de la actividad encontrada en esta fracción. En este sentido, cabe resaltar que la presencia de dos amilasas en especies

de *Streptococcus* está reportada. Satoh *et al.* (1997) reportaron dos amilasas: AmyA y AmyB para *S. bovis* 148, siendo AmyA una  $\alpha$ -amilasa extracelular capaz de unirse y degradar el almidón insoluble, producida en mayor proporción que AmyB, una  $\alpha$ -amilasa intracelular incapaz de unirse y degradar al almidón insoluble. Por otro lado, *S. bovis* JB1 produce también dos amilasas: una asociada a célula y otra extracelular, producidas por la cepa dependiendo de la fuente de carbono en la que crezca (Freer, 1993).

Los zimogramas mostraron una banda de actividad de alta masa molecular que no se observó degradada ni en una masa menor, lo que indicaría que la actividad amilolítica medida en el filtrado del sobrenadante del lisado no se debió a un producto de degradación de la amilasa de mayor masa molecular. Sin embargo, no se observó la banda de menor masa (Figura 12), la cual se habría esperado obtener en un rango de masa molecular menor a 100 kDa. Deben considerarse las condiciones desnaturalizantes iniciales con las que son tratadas las proteínas para realizar la electroforesis. En ensayos zimográficos, aunque se diluya la concentración de SDS en los geles con buffers de renaturalización, existen proteínas que pierden capacidad para renaturalizarse adecuadamente, pudiendo mostrar una baja o nula actividad en los zimogramas (Cazenave y Toulmé, 2001; Hu y Beeton, 2010); ésta pudo ser la razón de no observar actividad amilolítica en un peso molecular más bajo en los geles de los zimogramas obtenidos hasta este punto. Por otro lado, el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie mostró el mismo patrón de bandas que el lisado celular, indicando que no hubo separación en el sobrenadante del lisado concentrado y pese a que el resto de las proteínas se haya concentrado, no fue así para la banda de proteína esperada alrededor de los 250 kDa (Figura 12). Este resultado sugiere que hayan ocurrido dos fenómenos: uno, la obstrucción de la membrana del dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter por aglomerados de proteínas, que pudo ser la razón por la cual la muestra no se haya separado como se esperaba; y dos, la posible adsorción de proteína a las paredes de la membrana del dispositivo, impidiendo así la recuperación de la amilasa en la fracción soluble. Durante procesos de filtración de soluciones proteínicas, éstas tienden a obstruir membranas con tamaños de poro mucho más grandes que el tamaño de las proteínas monoméricas que forma la solución. Esto se atribuye a la presencia de proteínas aglomeradas que pueden ser hasta en tres órdenes de magnitud más grandes que los monómeros, obstruyendo de esta forma los poros de la membrana (Rezaei *et al.*, 2014). Los mecanismos de aglomeración proteínica son complejos y se han reportado interacciones membrana-proteína y proteína-proteína, que a su vez dependen también de las condiciones fisicoquímicas de la solución, así como de la estructura y composición de la membrana (Martin *et al.*, 2002).



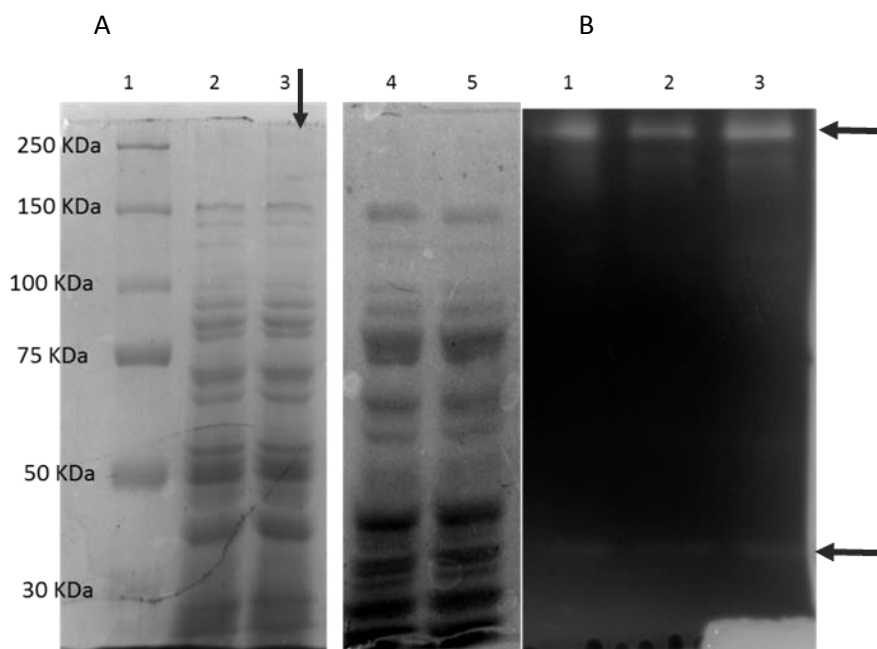
**Figura 12.** Electroforesis en gel de policarilamida en condiciones desnaturalizantes del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* concentrado con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. **A:** SDS-PAGE, tinción con azul de Commassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: sobrenadante del lisado de *Sii-25124* concentrado con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter; carril 3: muestra del sobrenadante del lisado de *Sii-25124* que se filtró con el dispositivo Amicon Ultra4 Centrifugal Filter. **B:** zimograma de actividad amilolítica. La flecha indica la banda de actividad amilolítica buscada. Carril 1: sobrenadante del lisado de *Sii-25124* concentrado con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter; carril 2: muestra del sobrenadante del lisado de *Sii-25124* que se filtró con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter.

### Concentración de la amilasa de *Sii-25124* por lisis celular

Se utilizó el mismo ensayo de la extracción por lisis celular usando el método enzimático-mecánico, incrementando volúmenes de cultivo (100, 250 o 500 mL) para llevarlos a un mismo volumen de lisado celular (10 mL); de esta forma, se tendrían los sobrenadantes de los lisados concentrados 10, 25 o 100 veces. La Tabla 8 muestra el resultado de las concentraciones obtenidas, notándose que la mejor forma de concentrar la amilasa fue concentrando 25 veces, pues se obtuvo una concentración de 3.75, lo que contrasta con la concentración a 10 veces con 2.69 y a 50 veces con 0.53. En el SDS-PAGE se visualizó una tenue banda de alta masa molecular que corresponde con la masa de la banda de actividad amilolítica del zimograma (Figura 13). También en el zimograma se detectó una banda de actividad amilolítica débil en la zona de baja masa molecular (30-50 kDa) que puede corresponder a la actividad amilolítica encontrada en la fracción filtrada durante el uso del dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter.

**Tabla 8.** Resultados de la concentración de las amilasas de *Sii-25124* usando la extracción enzimático-mecánica para obtener los sobrenadantes de los lisados celulares concentrados.

	Actividad (U/mL)	Vol Fracción (mL)	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U7mg)	Rendimiento %	Enriquecimiento
<b>10x</b>							
Células	9.4±0.6	10	93.8	128±41.6	0.7	100	1
6γProtoplastos	8.7±0.4	10	87.1	52±4.4	1.7	92.8	2.3
Lisado	8.9±0.1	10	89	45±8.7	2.0	94.6	2.7
Restos	1.0±1.1	10	10.4	16±1.5	0.6	11	0.9
<b>25x</b>							
Células	6.9±0.6	10	68.6	342±33.4	0.2	100	1
Protoplastos	8.7±1.5	10	87.3	391±31.7	0.2	127	1.1
Lisado	<b>12.5±0.7</b>	<b>10</b>	<b>124.8</b>	<b>166±20.6</b>	<b>0.7</b>	<b>181</b>	<b>3.7</b>
Restos	0.4±0.2	10	4.25	73±3.5	0.05	6.2	0.3
<b>50x</b>							
Células	11.5±1.1	10	114.6	310±29.1	0.4	100	1
Protoplastos	10.7±0.6	10	107.3	291±21.5	0.4	93.6	1
Lisado	3.5±0.9	10	34.8	175±19.1	0.2	30.3	0.5
Restos	6.1±0.7	10	60.6	61±5.5	1.0	52.8	2.9

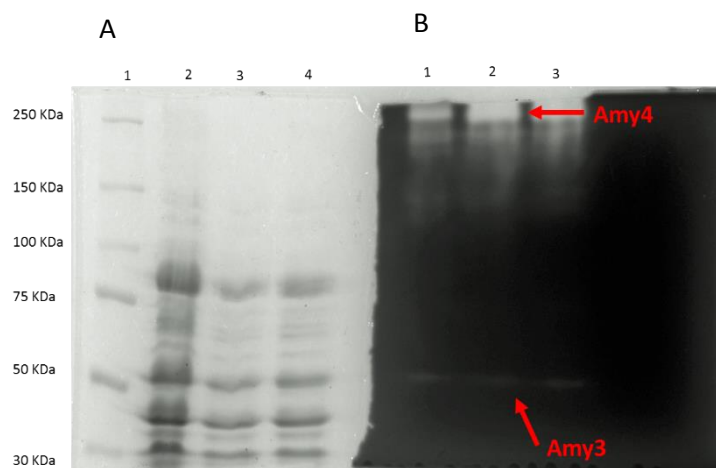


**Figura 13.** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de los sobrenadantes de los lisados celulares de *Sii-25124* concentrados 10, 25 y 100 veces. **A:** geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: sobrenadante del lisado concentrado 10 veces; carril 3: sobrenadante del lisado concentrado 25 veces; carril 4 y 5 (duplicado): sobrenadante del lisado concentrado 50 veces. **B:** zimograma de los sobrenadantes de los lisados celulares de *Sii-25124*. Carril 1: sobrenadante del lisado concentrado 10 veces; carril 2: sobrenadante

del lisado concentrado 25 veces; carril 3: sobrenadante del lisado concentrado 50 veces. Las flechas indican las bandas de actividad amilolítica.

## SECUENCIACIÓN DE LAS AMILASAS PRODUCIDAS POR *Sii-25124*

En los zimogramas de los experimentos realizados para concentrar la amilasa de *Sii-25124* de 250 kDa se observó en repetidas ocasiones una banda de baja masa molecular como en la Figura 13. Este resultado podría tratarse de una amilasa diferente. Los geles de poliacrilamida obtenidos después del tratamiento de purificación se muestran a en la Figura 14. En el gel teñido con azul de Coomassie no se observó la banda de alta masa molecular cercana a los 250 kDa, aunque sí se obtuvo una banda con actividad importante en dicho tamaño; por otro lado, en el gel teñido con Coomassie se observó la existencia de una banda de aproximadamente 50 kDa que podría correlacionarse con la banda tenue de actividad del mismo peso que se observó en el gel del zimograma. Aquí, la intensidad de la banda de 50 kDa en el gel teñido con Coomassie no necesariamente corresponde sólo a la proteína responsable de la banda de actividad que se observó en el zimograma, sino que probablemente es debida a otras proteínas del mismo tamaño molecular. Las bandas de actividad presentes en el zimograma (señaladas con flechas rojas en la Figura 14) fueron las que se cortaron y se secuenciaron. A la banda de alta masa molecular se le asignó arbitrariamente el nombre de Amy4, mientras que a la de baja masa molecular se designó como Amy3. La secuencia de aminoácidos obtenida para ambas enzimas se presenta en la Tabla 9.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de la separación de las amilasas de *Sii-25124* por unión al almidón insoluble. **A:** SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Imperial Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: fracción de protoplastos 25x de *Sii-25124*; carril 3: sobrenadante del lisado celular (antes de incubar con almidón insoluble) de *Sii-25124*; carril 4: sobrenadante del lisado celular residual (después de incubar con almidón insoluble) de *Sii-25124*. **B:** Zimograma obtenido por el método de extinción del complejo almidón-yodo teñido con yodo-yoduro al 4%. Carril 1: fracción de protoplastos de *Sii-25124*; carril 2: sobrenadante del lisado celular (antes de incubar con almidón insoluble)

de Sii-25124; carril 3: sorenadante del lisado celular residual (después de incubar con almidón insoluble) de Sii-25124. Las flechas rojas indican las bandas que fueron cortadas para su secuenciación.

**Tabla 9.** Resultados de las secuencias de las bandas Amy3 y Amy4 que se muestran en la Figura 14, así como los resultados del análisis de la secuencia para predecir identidad, masa molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción molar.

Banda	Características	Secuencia*	% Cobertura
<b>Amy 4</b>	100% Identidad con pululanasa extracelular de <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ATCC BAA-102 <sup>1</sup>  Tamaño 246,320 Da Punto isoeléctrico 4.62 Coeficiente de extinción molar a 280 nm: 365,340 M <sup>-1</sup> cm <sup>-12</sup>	mkkvsrlsfpekreyfgrkllkvgvasvaiatalfwgagltvsadqitaqaatsevsvtsspdssallesekavdvntqietvna sdvvdnsesqstpespvveetesqpqevisqtqevqgtaataeaidvktV TSAENSQVNLKSSqpdnqvsnppia edtrmhfqavtdnnyqydlwtwgavaepsdgnnwpaatpfsanqkddfgyyivdraqashgdigyllkngktsdsdq ikplskdvnevwtstfmsykppladriirinykrddgnydgwglwawgdvagfgawpsdaldftqegagyridlplsll dsnigllvnqndpekagntldmsfsdrdihsqiflhnddatvtnpyyiatvtgqdfskatpghnisvsassyrfpnyetldid vtvtnpenveitmjqidtaqiggrvieispelnrvitatsdtqpgtydlpvrvfkdngydyttvsvtkrvkqagevdwdeqvi yfmltdrfyngdpsndnpyhqdyagavngagvykggdfkgtakldylkqlgvtswiwwtpimdniprdvsteagkeyyyahgy waddfeklnphigtlddhdidqaaerginiivdvlnhsgytedkftgmvrTPEEDKGGDIQGSQSGLPDFKTEDAA VReqlvawqtawlektstaknriyavrdtvkhvddttwqyfknelalkdaadhvlgvesganykdtkgdltgtsmdslldfgf kdiaklvnrgLKEANDELIArndaitsaytlaqiflshdedgflysiggdinkklaatliltakgppviyyeelgqsgannwpyy dnryefdwddvagnaihehyqkllafrrdnseilvrGSHSTVAVNDSQGWLLAKrandsdaayilylnkdqsklhllseaa tvdyytgttyqallgqdgqyyldeiapaiskggtmllkvsagaitqafiaqteeepiaentlvhfktlpsddlasglwtwedvehp seswpgainlnkhdaiyyidvklvngnrhkvGLLINTSGENVSGEKvnvlisqdmnevfwfdeydnyanyaplegk kirinyrsdgnynklaiwlwgsadssitsrlgswpdgvdnfenfkygaidvpladfnegflllyeskegdaaikppndtyfkda nqtqiflkdedktytnpyfvstirltsaqisqselvaisnladadkaellenkvtdkagnvvaidditldkasnkviiegdfssdglyt vsyngdqyqaqqsqwytdskyaydglgervfdngvrvtwspnadnsvvlydkndqtkvvgkiamikgdkgqwsaslt sslgldisdygyyyhyeitrgketvldpyakslaewnsdligtdpsykvakaividtsaignqldtyadikgykdredaiyehv rdftsdaiseelnqfgtfaafaekldylqslgthiqlpvmssyyvnevmmnkrldtyassntnywgydpqsyfalgmyse npadpakriiefknlneihkrmgvildvynhta d lailedlepnyyhfmeadgkaktsgggrrpgtthymtrmrvldsiayw tkefkvdgrfdmnglddaetvqmaydakalnprnvmilgegwtiyagdandsrpadqtmahdtsvasfsddirnlksg ypsegapcfitggvynLQELFNISIKaqpnnftaddpgdviqiaahdnltldiaiaSIHKDPSVAENEAEILRRqrlgnliit sqgtafihsgqeygrtkrdeayktpvatdqvpaksdltnadgtpfvpyfisdystdaihfdwakatdkgvpyenaktqa ytkglialrstdaftlktkadvdskvklitipnengvgqedliayqtqasngdiyavfvnadskarefvsddykallnaevladadta gvdailnpgGVAFTENSITLNLPTATILRLRKENAETERTlydqesgsvilapgereeitqievhhketdtdsqipsvlqgd yldydikpedayghvsttqkqvilpidagkavaevfypknaqpqlafrevsklvagvkvfivfdvdfhfnqygyvqqdqvakt evpansnqskaiapakttqvrnqaasrslldlqkvavtenstvalpetgkqsktltfvgllslaslavlevkrrqksh	6%
<b>Amy 3</b>	100% de identidad con alfa-amilasa de <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ATCC BAA-102 <sup>1</sup>  Tamaño: 55,763.4 Da Punto isoeléctrico: 5.15 Coeficiente de extinción molar a 280 nm: 114,375 M <sup>-1</sup> cm <sup>-12</sup>	mtnetlmqyfewylpndgkhwR LAADASHLAQKgitkiwmpafkathdsdvgygyvdfldfgefnqkgirtkygtka dyleaisalkNNGIEPLADVILNHKAAADHTEFTKVVVEVAPEDRTKVISQPFIEGWTNFTFEGRhrayndfewh wyhftgtdydvktgTGIFLIQGDNKgwanqelvdgengnydlymyadldfkhpevikniydwadwfvettgkygfrldaik hidsffmrnfirdmkakynsfyvfgefwngeknsndyldstdyrFDLVDVRLHQLNFEASKakeaydlrQJFEQLTVK NHPDSAVTFVDNHDTRGqaestieewfpaayailrrqtgpcifygygsgqfaesqfvtidkllrknavygqeld yfdqancigwctlgddkhpatalavlinnskatkrmfvegekwaqkftdalgnqaaahvqideqgygdfvgekeSISTWIPLTK	26.5%

\*En mayúsculas se destacan los aminoácidos que conformaron los péptidos obtenidos por el análisis por MS/MS.

<sup>1</sup> Según UniProtKB Bacteria Database. Se usó un BLASTP versión 2.2.31+

<sup>2</sup> Según la herramienta ProtParam provista por el portal ExPASy Bioninformatics Resource Portal

El análisis de comparación de secuencias realizado con la herramienta BLAST provista por la página web del NCBI dio como resultado para la enzima Amy4 de alta masa molecular 100% de correspondencia de los ocho péptidos secuenciados con péptidos de la amilopululanasa extracelular de la cepa tipo de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* ATCC BAA-102, de la cual se tiene registrada la secuencia de su genoma en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information, 2018) con número de acceso EDT46783. En el caso de la enzima Amy3, de baja masa molecular, se obtuvo un 100% de correspondencia de los cinco péptidos secuenciados con péptidos de la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de la misma cepa tipo (número de acceso EDT47408, NCBI, 2012). No

se encontró identidad entre ambas enzimas tras realizar su alineamiento usando la herramienta BioEdit Sequence Alignment Editor (Anexo VI), es decir que se trata de amilasas diferentes producidas por *Sii-25124*.

## **Amilopululanasa de *Sii-25124***

La banda cercana a los 250 kDa, que siempre se observó en los geles del zimograma teñidos con yodo-yoduro por el método de extinción del complejo almidón-yodo (Figuras 10 a 14), mostró coincidencias, según el análisis de la secuencia por medio de la herramienta BLAST (NCBI, 2017), con una amilopululanasa de 246.3 kDa, tamaño calculado por la herramienta ProtParam (ExpASY Bioinformatics Resource Portal, 2017), el cual fue muy semejante al tamaño de la amilasa encontrada en los geles obtenidos a lo largo del trabajo experimental (Figuras 10 a 14). Su identificación como una posible amilopululanasa justificaría su alta masa molecular ya que normalmente este tipo de enzimas poseen una masa molecular entre 80 y 250 kDa, siendo de las proteínas más grandes dentro de la familia GH13 (Nisha y Satyanarayana, 2013a). Por ejemplo, la amilopululanasa de *Lactobacillus plantarum* L137 tiene una masa molecular de 211.5 kDa (Kim *et al.*, 2008), la de *Geobacillus thermoleovorans* NP33 de 180 kDa (Nisha y Satyanarayana, 2013b) y la de *B. stearothermophilus* TS-23 de 223.8 kDa (Chen *et al.*, 2001); mientras que las amilopululanases de *L. amylophilus* GV6, *L. paracasei* B41 y *B. cereus* H1.5 tienen un tamaño de 90, 67 y 93 kDa, respectivamente (Vishnu *et al.*, 2005; Hii *et al.*, 2009; Petrova y Petrov, 2012). La función o el porqué de una masa molecular alta en algunas de ellas no se ha esclarecido por completo; sin embargo, se puede deber al número de sitios activos que poseen o a la presencia de varias secuencias repetidas que pueden tratarse de módulos de unión a carbohidratos o de secuencias de aminoácidos que podrían participar en la unión al sustrato, el correcto plegamiento y/o a la estabilidad de la proteína (Kim *et al.*, 2009; Nisha y Satyanarayana, 2013a).

La producción de una amilopululanasa por parte de una bacteria ácido láctica amilolítica es interesante desde el punto de vista de la adaptación a nichos específicos. Las bacterias ácido lácticas se encuentran distribuidas ampliamente y están presentes en ambientes vegetales, lácteos y animales, sugiriendo asimismo una adaptación especializada a cada uno de estos nichos (Makarova *et al.*, 2006). Existe una diferencia entre los genomas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos y las aisladas a partir de alimentos vegetales fermentados, lo que evidencia su flexibilidad ecológica (Turpin *et al.*, 2011). Estudios genómicos sobre éstas últimas muestran una gran variedad de genes involucrados en el metabolismo del almidón, teniendo el potencial de hidrolizarlo gracias a la presencia, principalmente, del gen  $\alpha$ -*amy*, que codifica para la enzima  $\alpha$ -amilasa, y en menor medida al gen *dexC*, que en general codifica para enzimas pululanases. Por otro lado, bacterias ácido lácticas no amilolíticas que no cuentan con la presencia de los genes  $\alpha$ -*amy* y/o *dexC*, poseen en vez genes que codifican para enzimas capaces de hidrolizar o usar la maltosa, como el gen *malP* y el gen *agl* (Turpin *et al.*, 2011). Este hallazgo es consistente con la presencia habitual de bacterias ácido lácticas amilolíticas en alimentos amiláceos fermentados, sugiriendo que éstas poseen la capacidad de iniciar la hidrólisis del almidón y que dan paso a la formación de oligosacáridos que pueden ser utilizados por otras bacterias lácticas no amilolíticas, creando relaciones tróficas y diversas comunidades microbianas a lo largo de la fermentación de la materia prima (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a; Turpin *et al.*, 2011).

Por otro lado, la asociación de la amilopululanasa a la superficie celular de *Sii-25124* es una característica poco común en las amilasas, ya que la mayoría de ellas son de tipo extracelular debido a la ventaja fisiológica que le brinda a la célula el poder degradar el almidón en el exterior celular, para después permitir la entrada de glucosa u oligosacáridos más pequeños. Una posible razón de que la amilopululanasa de *Sii-25124* se encuentre unida a su superficie celular, es al nicho del que proviene y al que esta cepa se ha adaptado a lo largo de los años. Siendo la masa inicial del pozol un sustrato con poca humedad en el que claramente ni las bacterias ni el sustrato se encuentran en solución, *Sii-25124* fisiológicamente no necesitaría excretar una amilasa. En términos de conveniencia, es más sencillo que su amilasa permanezca unida a ella para poder hidrolizar el almidón cercano y transportar al interior los oligosacáridos que se produzcan en la cercanía.

La amilopululanasa de *Sii-25124* se comparó con otras pululanases y amilopululanases bacterianas con la ayuda de la herramienta BLASTP provista por el portal NPSA (Network Protein Sequence Analysis, 2017) y el editor BioEdit Sequence Alignment Editor. Los resultados de la comparación se resumen en la Tabla 10. De la tabla, para el caso de las amilopululanases de *Lactobacillus plantarum* L137 y *Lactobacillus paracasei* B41, cabe la posibilidad de cuestionar si realmente se trata de amilopululanases, no sólo debido a la baja identidad entre ellas y la de *Sii-25124*, sino que al revisar su secuencia en la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 20108) sólo se observan, para el caso de la enzima de *L. paracasei* B41, dominios propios de la actividad  $\alpha$ -amilolítica, y no hay identificados dominios de la función pululanolítica; mientras que para el caso de la enzima de *L. plantarum* L137 se observan dominios propios de pululanases, pero no de  $\alpha$ -amilasas, además de que cuenta con otro tipo de dominios que no se identificaron en la secuencia de ninguna otra enzima aquí analizada.

**Tabla 10.** Pululanases y amilopululanases con las que se compararon los dominios de la amilopululanasa de *Sii-25124*.

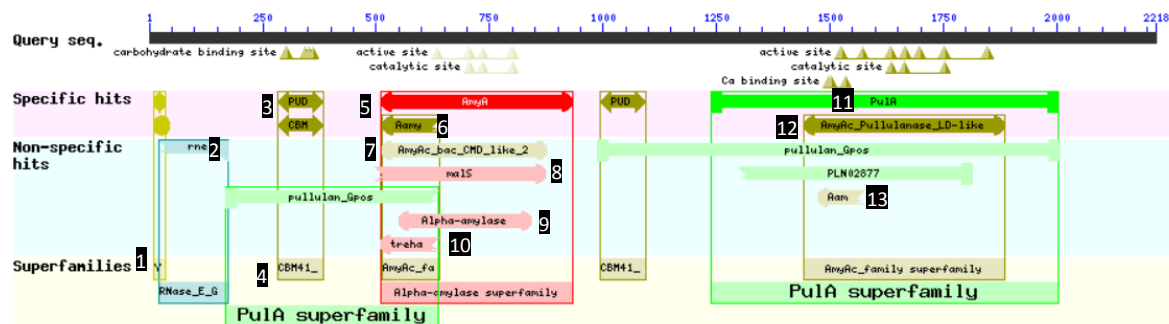
Microorganismo	Cepa	Tipo de enzima	Número de acceso NCBI/UniProt	Identidad con amilopululanasa de <i>Sii-25124</i>
<i>Thermotoga maritima</i>	ATCC43589	Pululanasa	AKE27719.1	10%
<i>Bacillus subtilis</i>	168	Pululanasa	COSPA0.1	9%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Pululanasa	P07206	10.2%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1 GAS	Pululanasa	Q99XX8	28.7%
<i>Streptococcus infantis</i>	ATCC700779	Pululanasa	EFX37165.1	31.3%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6	Pululanasa	WP_001232763.1	31.5%
<i>Streptococcus equi</i>		Pululanasa	CRR04838.1	34.1%
<i>Streptococcus bovis</i>	JB1	<b>Amilopululanasa</b>	<b>KFN88274.1</b>	<b>97.6%</b>
<i>Streptococcus suis</i>	JS14	Amilopululanasa	ADV71067.1	56.4%
<i>Bacillus sp.</i>	NRRL B-14911	Amilopululanasa	EAR68733.1	31%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	L137	Amilopululanasa	BAF93906.1	11.8%
<i>Lactobacillus paracasei</i>	B41	Amilopululanasa	E0AE74	6%

No se encuentran reportadas experimentalmente las actividades ni la purificación de las pululanases de *S. pyogenes* M1 GAS, *S. infantis* ATCC 700779 y *S. equi*, así como tampoco de las amilopululanases de *Bacillus sp.* NRRL B-14911 y *S. bovis* JB1, siendo ésta última la que presentó alta homología con la de *Sii-25124*; sin embargo, sólo se reporta *in silico* gracias a la secuenciación del genoma de la cepa que Benhamed *et al.* realizaron en 2014. La amilopululanasa de *S. suis* JS14 fue la segunda en presentar un alto porcentaje de identidad con la de *Sii-25124*. Esta enzima pudo



obtenerse de forma recombinante a partir de *S. suis* 10 por Ferrando *et al.* (2010), quienes mostraron el rol de la enzima en la adhesión a las células de epitelio y mucus porcino *in vitro*, así como la relación del uso de carbohidratos por parte de *S. suis* y su capacidad para colonizar e infectar hospederos.

El análisis de la secuencia de la amilopululanasa de *Sii-25124* reveló la existencia de 13 dominios, los cuales se muestran gráficamente en la Figura 15.



**Figura 15.** Dominios conservados encontrados en la enzima Amy4 de alta masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. Se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamientos básicos locales, BLAST, provista por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2017).

**Tabla 11.** Lista de dominios conservados encontrados en la enzima Amy4 de alta masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. Los números hacen referencia a las regiones mostradas en la Figura 15.

Región	Nombre de dominio	Intervalo de aminoácidos	Valor-E	Referencias
1	Señal YSIRK	8-47 y 11-35	$1.29 \times 10^{-6}$	Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Bae y Schneewind, 2003.
2	rne, de la superfamilia de las ribonucleasas E/G	21-173	$1.07 \times 10^{-3}$	Lee <i>et al.</i> , 2003; Callaghan <i>et al.</i> , 2005
Superfamilia PuA				
3	PUD	283-383 y 994-1094	$6.09 \times 10^{-21}$	Yeats <i>et al.</i> , 2003
4	CBM 41	283-385 y 994-1096	$1.16 \times 10^{-19}$	Mikami <i>et al.</i> , 2006; Turkenburg <i>et al.</i> , 2009; Guillén <i>et al.</i> , 2010
11	PuA	1239-2002	$1.54 \times 10^{-178}$	Janeček, 1995; Bibel <i>et al.</i> , 1998
12	AmyAC de enzimas pululanastas y similares	1443-1885	$1.05 \times 10^{-153}$	Henrissat <i>et al.</i> , 1995; Sairan <i>et al.</i> , 2017
13	Aamy, dominio $\alpha$ -amilasa	1470-1576	$1.96 \times 10^{-17}$	Henrissat <i>et al.</i> , 1995; Davies y Henrissat, 1995.
Superfamilia $\alpha$ -amilasa				
5	AmyA	510-934	$3.96 \times 10^{-38}$	Raha <i>et al.</i> , 1992
6	Aamy, dominio $\alpha$ -amilasa	514-639	$4.12 \times 10^{-35}$	Henrissat <i>et al.</i> , 1995; Davies y Henrissat, 1995.
7	AmyAC, dominio catalítico de ciclomaltodextrinas bacterianas y relacionadas	509-878	$4.28 \times 10^{-73}$	Mikami <i>et al.</i> , 2006; Turkenburg <i>et al.</i> , 2009.
8	maIS	498-875	$7.86 \times 10^{-73}$	Schneider <i>et al.</i> , 1992; Spiess <i>et al.</i> , 1997.
9	Dominio alfa-amilasa	548-843	$2.14 \times 10^{-44}$	Larson <i>et al.</i> , 1994; Strobl <i>et al.</i> , 1998
10	Trehalosa_treC	506-636	$4.018 \times 10^{-18}$	Rimelle y Boos, 1994

**Tabla 12.** Porcentaje de identidad de los dominios de otras pululanosas, amilopululanosas y  $\alpha$ -amilasas con respecto a los dominios encontrados en la amilopululanasa de *Sii-25124*. Los porcentajes que se muestran de ésta última son con respecto a la secuencia consenso del dominio.

Microorganismo	Tipo	% Identidad de los dominios conservados de otras pululanosas con los dominios de la amilopululanasa de <i>Sii-25124</i>											
		YSIRK	Súperfamilia PulA					Súperfamilia $\alpha$ -amilasa					
			PUD	CBM41	PulA	AmyAC_Pullulanase Like	Aamy	Aamy	AmyA	AmyAC_bac_CMD like	malS	Alfa-amilasa	Trehalosa_treC
<b><i>Sii-25124</i></b>	<b>AmiloPul</b>	<b>61%</b>	<b>18%</b>	<b>37.7%</b>	<b>24.6%</b>	<b>35.7%</b>	<b>15%</b>	<b>25%</b>	<b>24%</b>	<b>32%</b>	<b>20%</b>	<b>30.4%</b>	<b>5.3%</b>
<i>T. maritima</i> ATCC43589	Pul	--	22%	20.7%	24.5%	27.7%	35%	---	--	---	---	---	---
<i>B. subtilis</i> 168	Pul	---	---	---	23.8%	29.8%	41.1%	---	---	---	---	---	---
<i>K. pneumoniae</i>	Pul	--	16%	16%	19.6%	22.8%	25.6%	---	---	---	---	---	---
<i>S. pyogenes</i> M1 GAS	Pul	---	31.4 %	---	61.4%	67.2%	71.4%	---	---	---	---	---	---
<i>S. pneumoniae</i> R6	Pul	42.3%	49.5 %	---	64.8%	72.6%	78.5%	---	---	---	---	---	---
<i>S. infantis</i> ATCC700779	Pul	38.4%	---	---	65%	72.6%	80.3%	---	---	---	---	---	---
<i>S. equi</i>	Pul	73%	---	---	66.2%	74.5%	78.5%	---	---	---	---	---	---
<b><i>S. bovis</i> JB1</b>	<b>AmiloPul</b>	<b>62.5%</b>	<b>26%</b>	<b>99%</b>	<b>96.2%</b>	<b>98.2%</b>	<b>98.8%</b>	<b>96.8%</b>	<b>98.1%</b>	<b>88.1%</b>	<b>90.2%</b>	<b>98.1%</b>	<b>97%</b>
<i>S. suis</i> JS14	AmiloPul	76%	28.8 %	42%	64.5%	74.5%	78.6%	70.6%	69.6%	73.9%	73.2%	77.4%	---
<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	AmiloPul	---	30.7 %	18.1%	41.5%	53.5%	51.3%	58.8%	52.5%	51.8%	51.8%	58.2%	---
<i>S. bovis</i> JB1	$\alpha$ -amy	---	---	---	---	---	---	12.6	12.4%	--	---	16.4%	13.8%
<i>S. bovis</i> 148	$\alpha$ -amy int	---	---	---	---	---	---	20.1%	13.3%	---	---	16.6%	10.8%
<i>S. bovis</i> 148	$\alpha$ -amy ext	---	---	---	---	---	---	21.4%	12.7%	---	---	17.7%	---
<i>L. plantarum</i> A6	$\alpha$ -amy ext	---	---	---	---	---	---	16.6%	11.5%	---	---	14.5%	---
<i>E. coli</i> K12	$\alpha$ -amy ext	---	---	---	---	---	---	---	---	---	19.4%	26.3%	13.4%
<i>K. pneumoniae</i>	$\alpha$ -amy ext	---	---	---	---	---	---	---	---	---	18.7%	25.2%	---

De los 13 dominios identificados en la amilopululanasa de *Sii-25124*, los cuales justifican su elevada masa molecular, cabe resaltar a varios de ellos, como la señal YSIRK, el modulo de unión a carbohidratos 41 (CBM41) y los dominios catalíticos de ambas funciones.

La señal YSIRK se trata de una señal de localización celular común de bacterias Gram positivas que consta de la secuencia Tyr-Ser-Ile-Arg-Lys (YSIRK), y que se ha encontrado en proteínas de superficie celular propias del género *Streptococcus*, *E. faecalis* y *Staphylococcus* (Bae y Schneewind, 2003). En la enzima de *Sii-25124* este dominio se encuentra como FGIRK (Phe-Gly-Ile-Arg-Lys), sin embargo, es común que la tirosina y la serina sean reemplazadas por otros aminoácidos: se han encontrado proteínas, como la lipasa de *Staphylococcus epidermidis* RP6 (Gill *et al.*, 2005; Número de acceso UniProt: Q5HKF42A) y la proteína de superficie asociada a biopelícula (putativa) de *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann *et al.*, 2005), en donde este motivo se encuentra en la forma FSIRK (Gill *et al.*, 2005). De igual forma, la serina puede ser reemplazada por una glicina (YGIRK), como en el caso de la proteína A de unión a fibronectina encontrada en *S. aureus* NCTC 8325 (Signas *et al.*, 1989).

El motivo YSIRK se clasifica dentro de las señales de localización para proteínas que se encuentran en superficie celular, por lo que puede ser necesaria para el anclaje de proteínas superficiales a membrana o pared celulares (Tettelin *et al.* 2001). Esto podría corroborar la hipótesis que se había propuesto sobre el hecho de que la amilasa de 250 kDa de *Sii-25124* está asociada a la superficie de la célula (Díaz, 2003; Virgilio, 2005), por lo que fue necesario primero extraerla para obtenerla en la fracción soluble. Los zimogramas realizados durante el proceso experimental mostraron una actividad prominente en las fracciones celulares y en las fracciones de protoplastos (Figuras 10 a 14), mientras que al hacer zimogramas usando muestras del medio de cultivo no se encontraron bandas de actividad (datos no reportados), demostrando que la enzima no se libera al medio sino que permanece en la superficie de la célula. Además, los experimentos sugieren que esta enzima está localizada no en la pared celular sino en la membrana, pues tras digerir esta última con lisozima se obtuvo la actividad en la fracción de protoplastos. Gracias al análisis de la secuencia de la amilasa Amy4 de *Sii-25124*, ahora es posible proponer que dicha asociación superficial puede ser debida al motivo YSIRK. Las pululanastas con las que se realizó la comparación de la señal YSIRK (Tabla 12) se sugieren como proteínas de membrana o pared celular, pero en realidad no se ha comprobado su localización a nivel experimental. Es necesaria tal vez una revisión y una mayor descripción del motivo para discernir entre proteínas de membrana, de pared celular o de excreción al exterior celular ya que la señal YSIRK se ha visto en proteínas que podrían encontrarse en cualquiera de estas tres localizaciones celulares. Es de notar que las pululanastas de *Sii-25124*, *S. bovis* JB1, *S. suis* SJ14 y *S. equi* poseen el motivo YSIRK en su versión FGIRK lo que podría ser parte de la diferencia entre encontrarse en pared o en membrana celular; sin embargo, es necesaria la caracterización de estas enzimas, así como un análisis más profundo respecto a los aminoácidos que conforman este dominio para conocer más respecto a él.

Por otro lado, la presencia del CBM41 estaría indicando la posible capacidad de la enzima de unirse al almidón insoluble, a la amilosa, a la amilopectina y al pululano (van Bueren *et al.*, 2004). Este dominio forma parte de la familia 41 de los módulos de unión a carbohidratos, el cual está distribuido en enzimas pululanastas y relacionadas, capaces de unirse no sólo a almidón sino también a amilosa, amilopectina, pululano y fragmentos derivados de estos polisacáridos (Guillén *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012). La capacidad de este dominio para unirse a estos sustratos sugiere la

posibilidad de que la enzima de *Sii-25124* los degrade, por lo que su actividad sobre ellos también ha de caracterizarse.

Finalmente, los dominios PUD, PuA y AmyAc\_Pullulanase\_LD-like, así como los dominios AmyA, AmyAc\_bac\_CMD-like, Amy y Alfa-amilasa constituyen los dominios que podrían indicar la doble función catalítica de esta enzima de alta masa molecular de *Sii-25124*, teniendo capacidad para hidrolizar enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$ . Los dominios PUD, PuA y AmyAC\_Pullulanase\_LD-like se encontraron en la región pululanolítica de la enzima, sugiriendo que serían los responsables de la actividad sobre enlaces  $\alpha(1-6)$  en pululano y almidón. Según la secuencia de la enzima, en el dominio PuA parece encontrarse el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , que es un sitio conservado para enzimas pululanosas, pues se encuentra en pululanosas como las de *Klebsiella pneumoniae* (Mikami *et al.*, 2006) y de *Bacillus subtilis* 168 (Malle *et al.*, 2006). Cabe resaltar que Mikami *et al.* (2006) reportaron que este sitio bien puede ser para unir  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , debido a que realizaron la cristalización de la enzima con iones  $\text{Mg}^{2+}$ . La presencia de este sitio en la amilopululanasa de *Sii-25124* implicaría la necesidad de este ión o algún otro ión divalente para el correcto plegamiento y funcionamiento de la enzima.

Por otro lado, los dominios Amy, AmyA, AmyAC\_bac\_CMD-like, y Alfa-amilasa se encontraron en la región  $\alpha$ -amilolítica de la amilasa de *Sii-25124*, sugiriendo que son los responsables de la hidrólisis de los enlaces  $\alpha(1-4)$  en almidón, amilosa y amilopectina, siendo relevante que a excepción del dominio Amy, son dominios que únicamente se encuentran en enzimas con actividad sobre enlaces  $\alpha(1-4)$ , ya que sólo se encontraron en otras amilopululanosas y en  $\alpha$ -amilasas. Estos dominios junto con los dominios catalíticos de la región pululanolítica fueron los que presentaron los tres plegamientos característicos de las glucosil-hidrolasas: el barril TIM, el bucle entre la tercera lámina  $\beta$  y la tercera  $\alpha$ -hélice y el motivo de llave griega en el carboxilo terminal, indicando que en toda la amilopululanasa existen al menos dos copias de estos tres plegamientos; sin embargo, aunque éstos se conserven, lo que parece delimitar a un dominio y a otro son las estructuras o los aminoácidos que se conservan por función catalítica, localización celular o relación filogenética (Janeček, 2002), ya que se observa que se guarda mayor identidad entre dominios conforme la relación filogenética de los microorganismos productores de las enzimas es más cercana, como en el caso de los dominios PuA y AmyAC\_Pullulanase\_like (Tabla 12) o también se observa que pueden guardar identidad por función catalítica, como en el caso de del dominio Amy, que es propio de la familia GH13 que, además de contener las regiones conservadas A, B y C, cuenta con la triada catalítica Asp-Glu-Asp. Este dominio es interesante porque se encontró tanto en la región pululanolítica como en la región  $\alpha$ -amilolítica de la enzima de *Sii-25124* (dominio número 6, Figura 15). Como se observa en la Tabla 13, el dominio presenta mayor homología entre dominios Amy con una misma función catalítica, lo que sugiere que aunque sea un dominio característico de la familia GH13, existen ciertas diferencias de acuerdo a la especificidad del sustrato, por lo que también se esperaría encontrarlo en otras enzimas pertenecientes a la familia. Esto sugiere que existen dominios Amy específicos de la función catalítica y aunque conserven identidad entre ellos, ésta es mayor si la función catalítica de los dominios es la misma. En este caso en particular, se observa mayor conservación entre dominios Amy de funciones pululanolíticas, que si se compara con dominios Amy de función  $\alpha$ -amilolítica y viceversa.

**Tabla 13.** Identidades (%) entre los dominios Amy de la amilopululanasa de *Sii-25124* y los de otras enzimas pululanosas, amilopululanosas y  $\alpha$ -amilasas de otros microorganismos.

Enzima	Identidad (%)	
	<i>Sii-25124</i>	
Pululanosas	Amy $\alpha$ -Amy	Amy Pul
<i>T. maritima</i>		
Amy Pul	17.9	35
<i>K. pneumoniae</i>		
Amy Pul	16	25.6
<i>B. subtilis</i> 168		
Amy Pul	19.8	41.1
<i>S. pyogenes</i> M1 GAS		
Amy Pul	16.4	71.9
<i>S. pneumoniae</i>		
Amy Pul	21.1	78.5
<i>S. equi</i>		
Amy Pul	13.5	78.5
<i>S. infantis</i> ATCC 700779		
Amy Pul	21.2	80.3
Amilopululanosas		
<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911		
Amy Pul	14.2	51.3
Amy $\alpha$ -amy	58.8	22.5
<i>S. suis</i> JS14		
Amy Pul	15	73.6
Amy $\alpha$ -amy	70.6	18.6
<i>S. bovis</i> JB1		
Amy Pul	14.2	98.8
Amy $\alpha$ -amy	96.8	14.2
$\alpha$ -Amilasas		
<i>S. bovis</i> JB1		
Amy $\alpha$ -amy	12.6	7.4
<i>S. bovis</i> 148 extracelular		
Amy $\alpha$ -amy	21.4	22.4
<i>S. bovis</i> 148 intracelular		
Amy $\alpha$ -amy	20.1	12
<i>L. plantarum</i> A6		
Amy $\alpha$ -amy	16.6	21.4

### $\alpha$ -Amilasa citoplásmica de *Sii-25124*

La banda que tenuemente se observó en algunos de los zimogramas obtenidos durante el proceso de concentración de la actividad amilolítica (Figura 13) y durante el proceso de purificación para la secuenciación de la enzima responsable de la actividad (Figura 14), resultó corresponder a una  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de 55.7 kDa y con un punto isoeléctrico de 5.15, ambos calculados por la herramienta ProtParam (ExpASY Bioinformatics Resource Portal, 2017).

Existen otras cepas de *Streptococcus* con una segunda enzima con actividad amilolítica en el citoplasma: *S. bovis* 148, que produce una amilasa extracelular de 77.34 kDa y una citoplásmica de 56.65 kDa (Satoh *et al.*, 1993 y 1997); y *S. bovis* JB1 que produce una extracelular de 75 kDa que se

expresa al cultivar el microorganismo con maltosa como única fuente de carbono, y otra inducible por almidón, que además está asociada a la superficie celular (Freer, 1993).

Con el fin de observar identidad u homología entre diferentes  $\alpha$ -amilasas bacterianas se realizaron alineamientos de la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de *Sii-25124* con  $\alpha$ -amilasas intracelulares y extracelulares del mismo género bacteriano, así como con  $\alpha$ -amilasas extracelulares y citoplásmicas de otros géneros bacterianos (Tabla 14)

**Tabla 14.**  $\alpha$ -Amilasas con las que se compararon los dominios de la  $\alpha$ -amilasa de *Sii-25124*.

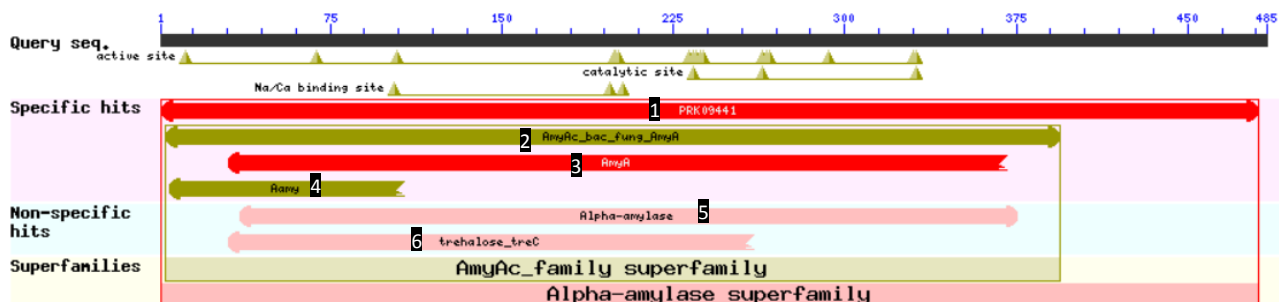
Microorganismo	Cepa	Tipo de enzima	Número de acceso NCBI/UniProt	Identidad con $\alpha$ -amilasa de <i>Sii-25124</i>	Referencia
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	033	citoplásmica	WP_020916680.1	94%	---
<i>Streptococcus bovis</i>	148	citoplásmica	AB000830.1	83.3%	Satoh <i>et al.</i> (1997)
<i>Streptococcus oralis</i>		citoplásmica	KXU14906.1	70.4%	Denapaitte <i>et al.</i> (2016)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG 1831	citoplásmica	AAV61145.1	69%	Bolotin <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia coli</i>	K12	citoplásmica	BAA15755.1	40%	Raha <i>et al.</i> (1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		extracelular	WP_076984033.1	43%	
<i>Streptococcus bovis</i>	JB1	extracelular	KFN88240.1	14%	Benahmed <i>et al.</i> (2014)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		extracelular	COD81474.1	11%	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	A6	extracelular	AAC45780.1	9.7%	Giraud y Cuny (1997)
<i>Streptococcus equi</i>		extracelular	WP_021321144.1	8.8%	
<i>Streptococcus bovis</i>	148	extracelular	AB000829.1	8.5%	Satoh <i>et al.</i> (1997)

Es interesante observar la alta identidad entre amilasas citoplásmicas pese a que sean producidas por géneros bacterianos diferentes; mientras que con las amilasas extracelulares las identidades fueron muy bajas incluso con especies tan cercanas como *S. bovis*, considerando los casos de las cepas 148 y JB1, que poseen  $\alpha$ -amilasas extracelulares que sólo comparten 8.8% y 8.5% de identidad con la  $\alpha$ -amilasa intracelular de *Sii-25124*, respectivamente. La identidad más alta obtenida fue con la amilasa citoplásmica de *S. lutetiensis* 033, seguida de la amilasa citoplásmica de *S. bovis* 148, pero incluso con especies alejadas filogenéticamente, como *B. amyloliquefaciens* y *E. coli* K12, la identidad entre amilasas citoplásmicas fue de alrededor del 40%, mientras que en amilasas extracelulares del mismo género sólo hubo alrededor del 10% de identidad. Esto sugiere que la conservación de aminoácidos en las proteínas obedece más a la función (localización celular) que a la relación filogenética entre especies.

El análisis de la secuencia de la amilasa citoplásmica de *Sii-25124* reveló la existencia de 6 dominios, los cuales se muestran gráficamente en la Figura 16 y se describen en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Lista de dominios conservados en la enzima Amy3 de baja masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. Los números hacen referencia a las regiones mostradas en la Figura 16.

Región	Nombre de dominio	Intervalo de aminoácidos	Valor-e	Referencias
Superfamilia $\alpha$ -amilasa				
1	PRK09441	1-481	$0 \times 10^0$	Raha <i>et al.</i> , 1992
2	AmyAc_bac_fung_AmyA	3-394	$1 \times 10^0$	Suvd <i>et al.</i> , 2000; Nonaka <i>et al.</i> , 2003; Kanai <i>et al.</i> , 2004
3	AmyA	30-371	$1.7 \times 10^{-21}$	Freundlieb y Boos, 1985; Tapio <i>et al.</i> , 1991; Raha <i>et al.</i> , 1992; Rimmel y Boos, 1994; Liebl <i>et al.</i> , 1997.
4	Aamy	4-107	$6.41 \times 10^{-21}$	Henrissat <i>et al.</i> , 1995; Davies y Henrissat, 1995
5	Dominio alfa-amilasa	35-376	$1.2 \times 10^{-24}$	Larson <i>et al.</i> , 1994; Strobl <i>et al.</i> , 1998
6	Trehalosa_treC	30-260	$1.3 \times 10^{-5}$	Rimelle y Boos, 1994



**Figura 16.** Dominios conservados encontrados en la enzima Amy3 de baja masa molecular obtenida del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*. Se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamientos básicos locales, BLAST, provista por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnological Information, NCBI, 2017).

Es interesante observar que se identificaron sólo 6 dominios en la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de *Sii-25124* en contraste con los 13 dominios identificados en su amilopululanasa, lo que le confiere la masa molecular propia de este tipo de enzimas, que oscila entre 50-60 kDa; sin embargo, esta característica depende mucho del tipo de dominios con el que cuente y a este respecto, los módulos de unión a carbohidratos, de los cuales pueden presentarse varias copias en tándem, son los que más aumentan el tamaño de las amilasas. En este sentido, es de resaltar que en la amilasa citoplásmica de *Sii-25124* no se identificaron módulos de unión a carbohidratos, lo cual también contrasta con la amilopululanasa.

Resaltan los dominios PRK09441 y AmyAc\_bac\_fung\_AmyA que sólo se encontraron en amilasas citoplásmicas, lo que podría reforzar la posibilidad de la localización celular de la  $\alpha$ -amilasa de *Sii-25124*. El dominio PRK09441 se encuentra en  $\alpha$ -amilasas citoplásmicas de otras especies de *Streptococcus*, así como de otros géneros como *Bacillus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Halothermothrix*. Este dominio no se encontró en las amilasas extracelulares de *S. bovis* 148, *S. bovis* JB1, *S. equi*, *S. pneumoniae*, *L. plantarum* A6 y *B. amyloliquefaciens* debido a que es propio de amilasas citoplásmicas (Raha *et al.*, 1992).

En el dominio AmyAC\_bac\_fung\_AmyA parece encontrarse el sitio catalítico de la región  $\alpha$ -amilolítica, así como un sitio de unión a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Figura 16), lo que podría indicar que esta enzima citoplásmica puede funcionar mejor con uno o con otro ión, o con ambos, y contrasta con el sitio encontrado para la amilopululanasa, que se identificó sólo como un sitio para unir  $\text{Ca}^{2+}$ . El sitio de unión a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se identifica cuando existen reemplazos de residuos aminoácidos en el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , observándose que los residuos Asp-161, Asp-183, Asp-200 y Asp-204 que se localizan en las amilasas que requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para su estabilidad y función (como la de *Bacillus licheniformis* y la de *A. oryzae*), son reemplazados por Asn-161, Asn-183, Asn-200 y Ser-204 en amilasas que requieren  $\text{Na}^+$ , como es el caso de la amilasa de *Bacillus* sp. KSM-K38 (Nonaka *et al.*, 2003). Estos reemplazos reducen las cargas negativas de los sitios de unión a cationes, induciendo la unión a metales monovalentes en vez de metales divalentes. El dominio AmyAc\_bac\_fung\_AmyA corresponde a la secuencia de aminoácidos relacionada con amilasas bacterianas y fúngicas, que contiene las regiones A, B y C, propias de todas las glicosil-hidrolasas pertenecientes al clan de las  $\alpha$ -amilasas (GH-H) (Kuriki e Imanaka, 1999; MacGregor *et al.*, 2001; Kumar, 2011), fue por ello que se realizó una última comparación con respecto a una  $\alpha$ -amilasa producida por un hongo debido a que se trata de un dominio que se comparte entre amilasas bacterianas y fúngicas, por tanto se comparó con el dominio AmyAc\_bac\_fung\_AmyA de la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de *Colletotrichum graminicola* (número de acceso en el NCBI: EFQ25086.1).



**Tabla 16.** Porcentaje de identidad de los dominios de otras  $\alpha$ -amilasas con respecto a los dominios encontrados en la  $\alpha$ -amilasa de *Sii-25124*. Los porcentajes que se muestran de esta última son con respecto a la secuencia consenso del dominio.

Microorganismo	Tipo de enzima	% Identidad de los dominios conservados de otras $\alpha$ -amilasas con los dominios de la $\alpha$ -amilasa de <i>Sii-25124</i>					
		PRK09441	AmyAC_bac_fung_AmyA	AmyA	Aamy	Alfa-amilasa	Trehalosa_treC
<b><i>Sii-25124</i></b>	<b>Citoplásmica</b>	<b>58.5%</b>	<b>59%</b>	<b>13.3%</b>	<b>17%</b>	<b>18.6%</b>	<b>10%</b>
<b><i>S. lutetiensis</i> 033</b>	<b>Citoplásmica</b>	<b>94.6%</b>	<b>94%</b>	<b>98%</b>	<b>98%</b>	<b>95%</b>	<b>--</b>
<i>S. bovis</i> 148	Citoplásmica	83.7%	88%	81%	90%	88.8%	60.5%
<i>S. oralis</i>	Citoplásmica	71%	76%	57.7%	74%	75%	---
<i>S. thermophilus</i> LMG 1881	Citoplásmica	70.8%	75%	16%	74%	---	---
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Citoplásmica	46.1%	47.9%	35.4%	61%	38.7%	---
<i>E. coli</i> K12	Citoplásmica	40%	42.7%	32.1%	54%	36.8%	18.2%
<i>S. bovis</i> JB1	Extracelular	---	---	11%	11.4%	12.2%	11.6%
<i>S. bovis</i> 148	Extracelular	---	---	12%	14%	13.7%	---
<i>S. pneumoniae</i>	Extracelular	---	---	9.6%	15%	14.3%	--
<i>S. equi</i>	Extracelular	---	---	9%	13%	8.6%	---
<i>L. plantarum</i> A6	Extracelular	---	---	12%	12%	12%	---
<i>Colleotrichum graminicola</i>	Extracelular	---	41.3%	---	---	---	---

Una vez más se identificaron los dominios Alfa-amilasa, AmyA y Amy, que son característicos de las glucosil-hidrolasas, siendo el dominio Amy propio de la familia GH13 y que también se identificó en la amilasa de alta masa molecular de *Sii-25124*. Dados los porcentajes de identidad encontrados con respecto al dominio de otras  $\alpha$ -amilasas (Tabla 16) podría sugerirse que aunque se trate del mismo dominio catalítico, existe una diferencia clara entre dominios catalíticos de enzimas intra y extracelulares, aunada a la de especificidad de hidrólisis (Henrissat y Bairoch, 1993 y 1996). Esto se observa por las identidades altas entre dominios de  $\alpha$ -amilasas citoplásmicas (mayores al 50%) en contraste con las identidades con respecto a  $\alpha$ -amilasas extracelulares (menores al 20%). En general se observó que los dominios guardan mayor identidad entre enzimas con la misma localización celular, que entre enzimas relacionadas filogenéticamente.

## CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE LAS AMILASAS DE *SII-25124*

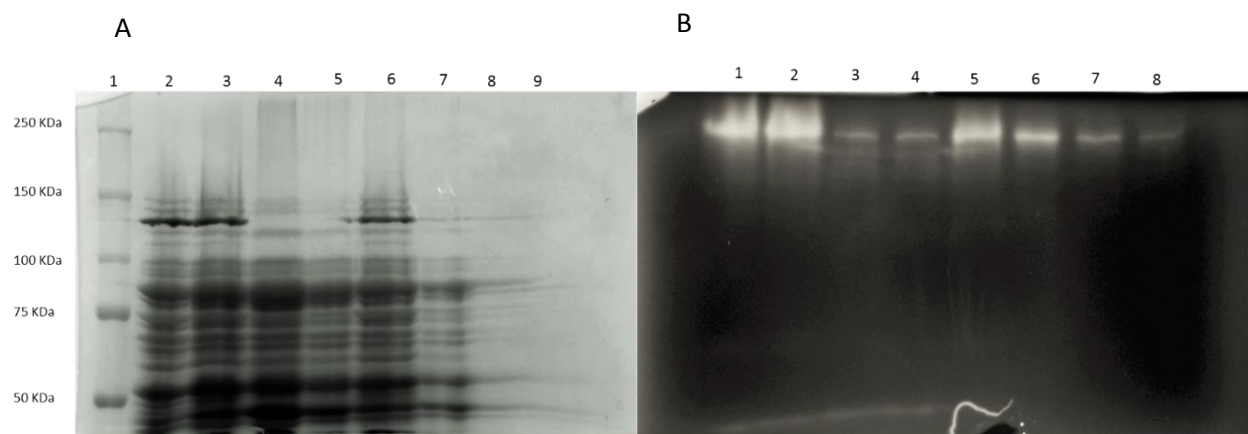
---

### Ensayos de unión a almidón insoluble

Aproximadamente el 10% de las amilasas poseen módulos no catalíticos cuya función es la de facilitar la unión y la degradación del almidón insoluble, los cuales se denominan dominios de unión al almidón (SBD) (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005; Machovic y Janecek, 2006; Guillén *et al.*, 2007). Las amilasas en general tienen masas moleculares de entre 50 y 60 kDa (Vihinen y Matsala, 1989; Giraud y Cuny, 1997); sin embargo, existen amilasas de alta masas molecular, como la de *L. amylovorus*, de 127 kDa (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000; Guillén *et al.*, 2007); la amilasa de *L. plantarum* A6 de 100 kDa (Giraud y Cuny, 1997; Guillén *et al.*, 2007) y la de *L. plantarum* S21, con 95.3 kDa (Kanpiengjai *et al.*, 2017). Todas ellas contienen más de un SBD: la de *L. amylovorus* consta de cinco SBDs dispuestos en tándem; la amilasa de *L. plantarum* A6, contiene cuatro secuencias repetidas en tándem, que corresponden a cuatro SBDs; y finalmente, la amilasa de *L. plantarum* S21 tiene cuatro SBDs idénticos conectados por regiones intermediarias o enlazadoras. Sin embargo, también hay amilasas de alta masa molecular que, aunque posean secuencias no identificadas como SBDs repetidas en tándem éstas no participan en la unión al sustrato, como la amilopululanasa de *L. plantarum* L137, de 211 kDa (Kim *et al.*, 2008 y 2009). Dada la alta masa molecular de la amilasa de *Sii-25124* (Figuras 10 a 14), así como de los resultados obtenidos a partir de su secuenciación se buscó conocer si esta enzima era capaz de unirse al almidón insoluble, lo cual podría ser una prueba experimental confirmatoria de la presencia del CBM41 identificado en su secuencia, aunque harían falta otro tipo de experimentos para demostrar dicha presencia. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y en la Figura 17.

**Tabla 17.** Fracciones de los ensayos de unión a almidón insoluble de la amilasa de 250 kDa de *Sii-25124*.

Fracción	Actividad (U/mL)	Volumen total de la fracción (mL)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Rendimiento %	Enriquecimiento
Células	60.8±10.7	25	1520	342±33.4	4.4	100	1
Protoplastos	65.8±17.4	25	1645	391.7±31.7	4.2	108.2	0.9
Sobrenadante del lisado celular	67.3±3.7	30	2018	166.2±20.6	12.1	132.7	2.7
Sobrenadante del lisado celular residual	62.2±3.2	30	1866	157.2±20.6	11.9	122.7	2.7
Botón celular	19.7±5	15	296	73.3±3.5	4.0	19.5	0.9
1ª elución	15.2	1	15.24	0.2	93.5	1.0	21.0
2ª elución	7.0	1	7.05	0.07	---	0.5	---
3ª elución	4.7	1	4.65	---	----	0.3	---



**Figura VIII.8.** Gel de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de las diferentes fracciones del ensayo de unión a almidón insoluble para las amilasas de *Sii-25124*. **A:** Gel de proteína teñido con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: células de *Sii-25124*; carril 3: protoplastos de *Sii-25124*; carril 4: sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* antes de incubar con almidón insoluble; carril 5: sobrenadante del lisado celular residual de *Sii-25124* (después de incubar con almidón insoluble); carril 6: botón celular de *Sii-25124*; carril 7: primera elución con  $\beta$ -ciclodextrina; carril 8: segunda elución con  $\beta$ -ciclodextrina; carril 9: tercera elución con  $\beta$ -ciclodextrina. **B:** zimograma revelado con  $I_2-I^-$  usando el método de la extinción del complejo almidón-yodo. Carril 1: células de *Sii-25124*; carril 2: protoplastos de *Sii-25124*; carril 3: sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* antes de incubar con almidón insoluble; carril 4: sobrenadante del lisado celular residual de *Sii-25124* (después de incubar con almidón insoluble); carril 5: restos celulares de *Sii-25124*; carril 6: primera elución con  $\beta$ -ciclodextrina; carril 7: segunda elución con  $\beta$ -ciclodextrina; carril 8: tercera elución con  $\beta$ -ciclodextrina.

La presencia de la actividad amilolítica de *Sii-25124* se encontró en el sobrenadante del lisado celular con una actividad de  $67.3 \pm 3.7$  U/mL enriqueciéndose 2.73 veces (Tabla 17) con respecto a la primera fracción del ensayo (células). Tras la incubación de este sobrenadante con almidón insoluble se esperaba que la actividad amilolítica disminuyera en el sobrenadante del lisado residual, es decir en el sobrenadante del lisado resultante después de la incubación con almidón

insoluble debido a la unión de la enzima responsable de dicha actividad al sustrato (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000; Guillén *et al.*, 2007). Sin embargo, se observó que el sobrenadante del lisado residual tuvo prácticamente la misma actividad que el sobrenadante del lisado inicial ( $62.2 \pm 3.2$  U/mL y  $67.3 \pm 3.2$  U/mL, respectivamente), lo que indicó que la amilasa de *Sii-25124* sólo se unió en un 7.5% con respecto a la actividad total presente en el sobrenadante del lisado inicial. Este comportamiento pudo deberse a posibles interacciones inespecíficas con diversas moléculas presentes en el sobrenadante del celular, que podrían participar en la obstrucción por impedimento estérico o por unión inespecífica al sitio de unión del sustrato (Cohelo *et al.*, 2012).

Pese a que poca enzima se unió al almidón insoluble, se logró encontrar actividad amilolítica en la primera elución al menos en uno de los triplicados que se realizaron del experimento, obteniéndose 15.24 U/mL, esto es un enriquecimiento de 21.05 veces. En la segunda y tercera eluciones, aunque se encontró actividad en al menos una de las tres réplicas experimentales, no existió suficiente proteína para poder cuantificarla y obtener valores de rendimiento y enriquecimiento (Tabla 17). Comparando los resultados de la Tabla 17 con el gel SDS-PAGE y el zimograma de la Figura 17 se observó que la actividad amilolítica se encontró presente en todas las fracciones del ensayo, siendo notoriamente intensa en las fracciones de las células, los protoplastos y el botón celular. El que se haya encontrado una actividad importante en el botón celular indicó que la enzima se retuvo en esta última fracción celular, ya sea por agregación o precipitación, probablemente por la alta concentración a la que se encontraba la muestra; o por la falta de condiciones iónicas y de solubilidad adecuadas para la proteína, ya que esta amilasa de alta masa molecular de *Sii-25124* puede ser de naturaleza membranal, dados los resultados experimentales de este y otros trabajos (Bondos y Bicknell, 2003; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a, Virgilio, 2005). Por otro lado, con la imagen del zimograma se corroboró que tanto el sobrenadante del lisado inicial como el sobrenadante del lisado residual mostraron prácticamente la misma actividad amilolítica; sin embargo, también hubo actividad en la primera elución, así como en la segunda y tercera, aunque en decremento, indicando que la enzima se unió al almidón insoluble, y que probablemente el método de cuantificación *in vitro* no es lo suficientemente sensible para detectar la actividad. Esto podría considerarse como una posibilidad de que el dominio CBM41 identificado en la secuenciación sí está presente en la amilasa de alta masa molecular de *Sii-25124*. La presencia de bandas de actividad más intensas en las dos primeras eluciones que en la banda del sobrenadante del lisado es debido a la concentración de la muestra: mientras que las muestras cargadas en los carriles del sobrenadante del lisado y del sobrenadante del lisado residual (3 y 4, Figura 17) fueron tomadas de 30 mL cada una, las muestras cargadas en los carriles de las eluciones (6 a 8, Figura 17) provinieron de 1 mL cada una. Con esto se observa que, aunque la mayor parte de la actividad amilolítica permaneció en el sobrenadante del lisado inicial y del residual, existió  $5.1 \pm 3.5$  U/mL que sí logró unirse al almidón insoluble y que se enriqueció 21.05 veces con respecto al sobrenadante del lisado inicial, evidenciándose en la banda de actividad resultante en el carril 6 del zimograma (Figura 17).

Los SBDs en amilasas de bacterias lácticas amilolíticas existen en especies de *Lactobacillus*, como *L. plantarum* (Giraud y Cuny, 1997; Kanpiengjai *et al.*, 2017), *L. amylovorus* (Giraud y Cuny, 1997; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000 y 2004) y *L. manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 2001). Existen, además, en amilasas de microorganismos amilolíticos como la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus niger*, con un SBD; en la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* también con un solo SBD; la  $\alpha, \beta$ -amilasa de *Paenibacillus polymyxa* con dos SBDs; y la pululanasa de *Thermotoga marítima* con un SBD (García

*et al.*, 2012). En especies de *Streptococcus* hay dos SBDs dispuestos en tándem en la  $\alpha$ -amilasa extracelular de *S. bovis* 148, que consta de una masa molecular de 79 kDa (Matsui *et al.*, 2007) y es capaz de unirse al almidón insoluble (Sato *et al.*, 1993 y 1997). La existencia de SBDs en la amilasa de *Sii-25124* es muy probable dado que sí se observó unión al almidón (Tabla 17 y Figura 17), además de que se identificó el módulo de unión a carbohidratos CBM41 como parte de su secuencia, y ha de resaltarse que dicho módulo pertenece a la familia de CBMs que se han identificado en enzimas pululanasa y relacionadas (Guillén *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012); sin embargo, la poca unión observada debe optimizarse encontrando las condiciones que permitan una unión más eficiente. Asimismo, es de interés encontrar la capacidad de adsorción de la amilasa al almidón insoluble, con el fin de obtener constantes de adsorción.

La poca actividad amilolítica que se reportó de las eluciones con el ensayo *in vitro* (segunda columna, Tabla 17) en contraste con la que se observó en el zimograma (Figura 17), pudo deberse a diferencias en la sensibilidad de los métodos, pues se ha reportado que la sensibilidad del zimograma revelado con la técnica de la extinción del complejo almidón-yodo puede detectar desde 50 pg de enzima (Boettcher y De La Lande, 1969; Brown *et al.*, 1982). Por otro lado, en el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie no se logró observar una banda definida en la zona próxima a los 250 kDa, en donde se obtuvo la actividad amilolítica mayoritaria de la bacteria. En general, un zimograma muestra una mayor sensibilidad que otros métodos de tinción de proteína como la tinción negro amido, observándose bandas de actividad en zonas donde la tinción de proteínas fue negativa (Boettcher y De La Lande, 1969; Kakefuda y Duke, 1984; Martínez *et al.*, 2000). La alta sensibilidad del método parece estar justificada por la difusión del almidón a través de los poros de la matriz de poliacrilamida, provocando asimismo que las bandas de actividad resulten poco definidas y poco nítidas, ya que de igual forma la amilasa difunde a través del gel (Boettcher y De La Lande, 1969).

Finalmente, cabe hacer notar la presencia de bandas irregulares de actividad en la zona próxima a los 50 kDa en los carriles de células, protoplastos, sobrenadante del lisado y sobrenadante del lisado residual (carriles 1 a 4 de la imagen B de la Figura 17). Estas bandas pueden correlacionarse con la actividad obtenida cuando se utilizó el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter, así como con las bandas observadas en el zimograma que se usó para la secuenciación de la amilasa citoplásmica de *Sii-25124* (Figura 14). Nótese que estas bandas ya no se observaron en los carriles correspondientes al botón celular ni en los de las tres eluciones. Este resultado podría estar corroborando que la proteína de baja masa molecular responsable de esta actividad se encuentra en la fracción soluble de la célula (citoplasma) y que además carece de SBDs que le permitan unirse al almidón insoluble, hecho que también se observó en el resultado de la secuenciación de esta enzima, en la que no se identificó ningún módulo de unión a carbohidratos.

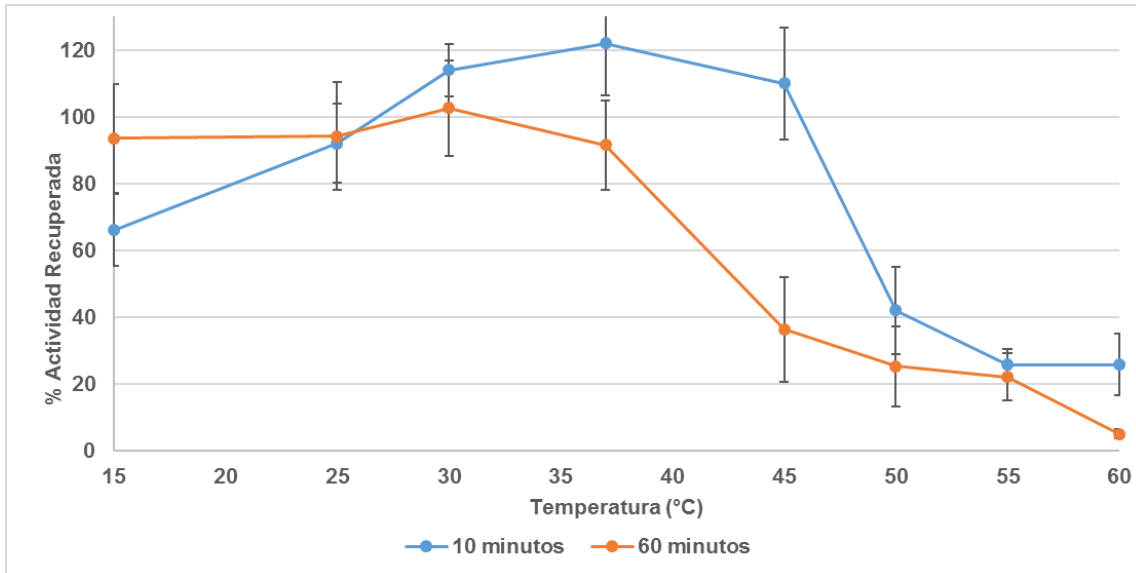
Dentro de las amilasas reportadas para otros géneros de *Streptococcus*, la amilasa intracelular de *S. bovis* 148 es incapaz de unirse al almidón insoluble; mientras que la extracelular sí puede unirse, encontrándose dos SBDs, identificados como propios de la familia 26 de los módulos de unión a carbohidratos (CBM26) (Sato *et al.*, 1993; Matsui *et al.*, 2007). Por otro lado, en la  $\alpha$ -amilasa extracelular de *S. bovis* JB1 también se identifican dos SBDs de la familia CBM26 capaces de unirse al almidón insoluble (Whitehead y Cotta, 1995), mientras que su amilopululanasa reportada *in silico*, cuenta con SBDs de la familia CBM41, igual que los que se sugiere para la enzima de *Sii-25124*. Asimismo, la amilopululanasa de *S. suis* JS14 posee este mismo SBD.

A partir del análisis de las secuencias de las amilasas se vio que la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de *S. lutetiensis* 033 fue la que mostró mayor identidad con respecto a la  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de *Sii-25124*, encontrando que en la secuencia de la amilasa de *S. lutetiensis* 033 tampoco existen SBDs. De hecho, en ninguna de las  $\alpha$ -amilasas citoplásmicas seleccionadas para el análisis de identidad con respecto a la  $\alpha$ -amilasa de *Sii-25124* se identificaron CBMs; sin embargo, sí se encontraron para algunas amilasas extracelulares, como en la de *S. bovis* JB1 y en la de *S. pneumoniae*. De la misma forma, las pululanastas seleccionadas para comparar con la amilasa de *Sii-25124* mostraron la presencia de SBDs de la familia CBM41, pero en este caso todas son pululanastas extracelulares. Estos análisis sugieren que el género conserva la presencia de SBDs para amilasas extracelulares, probablemente debido a la necesidad de hidrolizar polisacáridos del medio exterior para el subsecuente transporte de oligosacáridos o monosacáridos al interior celular.

El ensayo de unión al almidón insoluble no sólo brinda una sugerencia de la presencia de SBDs en la enzima de alta masa molecular de *Sii-25124*, sino que además se puede considerar una posible vía para la purificación de dicha enzima. La purificación de diversas amilasas utilizando la ventaja que brindan los SBDs, como en el caso de la amilasa de *L. amylovorus* (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000), *L. manihotivorans* y *L. plantarum* A6 (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005), permite rendimientos de hasta el 69% y 72 veces de enriquecimiento.

## **Efecto de la temperatura en la estabilidad de las amilasas de *Sii-25124***

Ya que se tenía reportada la temperatura óptima para la actividad de la amilasa de *Sii-25124* (37° C) (Díaz, 2004; Virgilio, 2005), se estudió el efecto de diferentes temperaturas a distintos tiempos de incubación sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*; la actividad amilolítica debe considerarse como la suma de las actividades amilolíticas de la amilasa asociada a membrana celular de alta masa molecular (246.32 kDa) y la citoplásmica de baja masa molecular (55.76 kDa). Se sabe que esta última enzima se encuentra presente en el sobrenadante del lisado, debido a la evidencia de los zimogramas obtenidos en los ensayos anteriores y aunque aparentemente parezca tener una actividad baja, no debe descartarse que posiblemente puede presentar poca renaturalización debido a las condiciones desnaturalizantes a las que se sometió para obtener los geles (Cazenave y Toulmé, 2001; Hu y Beeton, 2010). Los resultados de la actividad recuperada de las amilasas de *Sii-25124* se muestran en el Gráfico 1.



**Gráfico 1.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*. La actividad se midió a 37°C después de la preincubación de las enzimas a las diferentes temperaturas

En el Gráfico 1 se observa que la actividad fue más estable durante los tiempos cortos de incubación (10 minutos, curva azul) para todas las temperaturas evaluadas mientras que los tiempos prolongados (60 minutos, curva naranja) disminuyeron la actividad de las amilasas. De forma particular se observó que durante 10 minutos de incubación, las amilasas tienen más del 100% de actividad en un intervalo de 30°-45°C; mientras que a 60 minutos de incubación las amilasas muestran una actividad del 85-100% con respecto al control en un intervalo de temperatura de 25°-37°C.

En comparación con otras amilasas bacterianas, la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124* tiene una termoestabilidad similar a la de las amilasas extracelulares de *S. bovis* JB1 (Freer, 1993) y *L. amylophilus*, ambas con una estabilidad entre 30 y 40°C (Tabla 18). Se observa que en general las amilasas de bacterias lácticas amilolíticas presentan termoestabilidades dentro de 30 a 55°C, siendo *L. manihotivorans* LMG 18010 la que tiene mayor intervalo de estabilidad térmica. Debido al nicho ecológico al cual estos microorganismos se han adaptado, que corresponde a materiales amiláceos que sufren de una fermentación espontánea a la temperatura ambiente del trópico, sus amilasas presentan termoestabilidad a temperaturas entre 37-55°C. Por ello, es poco común que estas bacterias produzcan amilasas con termoestabilidades amplias, como es el caso de otras bacterias amilolíticas, como la de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *A. niger* que tienen estabilidad en su actividad a más de 100°C. Esta característica podría no hacerlas buenas candidatas para los procesos industriales que se tienen ya establecidos, en los que se requiere de enzimas capaces de resistir temperaturas entre 60-80°C; sin embargo, la baja termoestabilidad de las bacterias lácticas amilolíticas puede no tomarse como desventaja si se considera el ahorro de energía que supone unificar los pasos de licuefacción y sacarificación en uno solo, que es uno de los atractivos de utilizarlas (Petrova *et al.*, 2013). En este sentido, las amilasas de *Sii-25124* podrían facilitar la hidrólisis completa del almidón debido a que presentan actividades  $\alpha$ -amilolíticas y pululanolíticas.

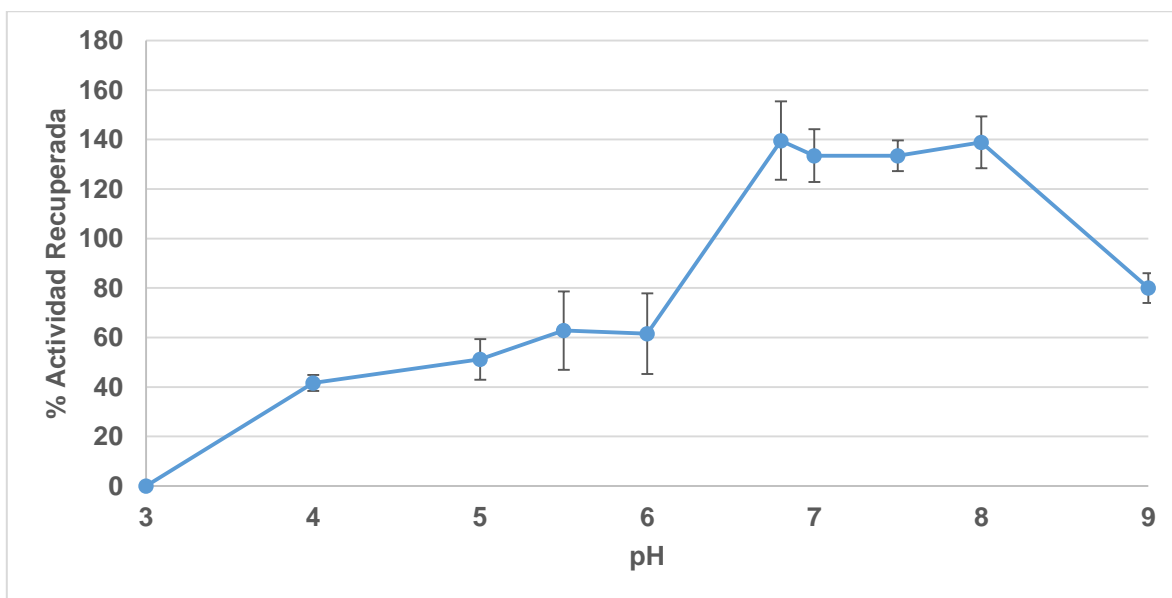
Su uso, al igual que el de otras bacterias ácido lácticas, podrían estandarizarse para procesos a bajas temperaturas que permitan altos rendimientos, ahorro de energía y costos.

**Tabla 18.** Comparación de la termoestabilidad de las amilasas de *Sii-25124* con otras amilasas bacterianas.

Especie	Enzima	Estabilidad térmica (°C)	Referencia
<i>S. infantarius</i> 25124	Sobrenadante del lisado celular con dos amilasas	30-45	Este trabajo
<i>S. bovis</i> JB1	$\alpha$ -amilasa extracelular	30-40	Freer, 1993
<i>L. amylovorus</i> ATCC 33620	$\alpha$ -amilasa extracelular	40-50	Castillo <i>et al.</i> , 1993
<i>L. amylophilus</i> NRRL B-4437	$\alpha$ -amilasa extracelular	30-40	
<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010	$\alpha$ -amilasa extracelular	55-65	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
<i>B. cereus</i> HI.5	amilopululanasa extracelular	30-55	Hii <i>et al.</i> , 2009

### Efecto del pH sobre la estabilidad de las amilasas de *Sii-25124*

Se estudió el efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*, sabiendo que el pH óptimo de su actividad es de 6.8 (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003a; Virgilio, 2005). Los resultados se muestran en el Gráfico 2.



**Gráfico 2.** Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*. La actividad recuperada se midió a pH 6.8, 37°C y 10 mM de MgCl<sub>2</sub> después de la preincubación de las enzimas a los diferentes pHs. Se reporta el promedio de tres réplicas experimentales.



En el Gráfico 2, se observa que la actividad amilolítica de *Sii-25124* fue cero en pH 3.0, y a partir de este valor fue aumentando, formándose una primera meseta en un intervalo de 5.5-6.0, obteniendo 62.8% y 61.6% de la actividad total, respectivamente. Después hubo un aumento pronunciado y la formación de una segunda meseta en el intervalo de 6.8 a 8.0, obteniéndose más del 100% de la actividad amilolítica con respecto al control. Después, la actividad disminuyó a 80% a pH 9.0. Probablemente la presencia de dos mesetas sea indicativo de los intervalos de estabilidad de una amilasa y otra frente al pH, pero no es posible saber a qué enzima corresponde uno u otro intervalo, considerando además que ambas amilasas podrían estar aportando cierto grado de actividad en cada uno.

El sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* presentó una precipitación inmediatamente al agregársele el buffer de fosfatos-citratos pH 3.0, lo que estaría sugiriendo precipitación por desnaturalización de la gran mayoría de las proteínas presentes, incluyendo a las amilasas. Por otro lado, la actividad de las amilasas disminuyó de 140% de actividad a pH 8.0 (con respecto al control) hasta un 80% a pH 9.0. Aunque aún es una actividad importante, este dato podría indicar que a pHs más altos la actividad podría seguir disminuyendo hasta volverse a inactivar. Sin embargo, es interesante la capacidad de las amilasas para mantener la actividad a un pH tan alcalino: por ejemplo, la amilasa extracelular de *S. bovis* JB1 se inactiva a pH 8.5 (Freer, 1993) mientras que la amilopululanasa de *B. cereus* H1.5 presenta 40% de actividad a pH 8.0 (Hii *et al.*, 2009) (Tabla 19). Existen amilasas cuya actividad óptima se encuentra en un pH alcalino, y son propias de organismos alcalófilos como la de *Bacillus* spp. IMD 370, con actividad máxima a pH 10.0 (Mc Tighe *et al.*, 1995); la de *Bacillus* spp. AB68, aislado del lago alcalino Van y con actividad óptima a pH 10.5 (Aygan *et al.*, 2008) o la amilasa de *B. licheniformis* MTCC1483 con actividad óptima a pH 8.0 (Dahiya y Rathi, 2015). Sin embargo, *Streptococcus infantarius* no es considerado un microorganismo alcalófilo o alcalino-tolerante, por lo que encontrar que la actividad amilolítica de sus amilasas se mantiene en porcentajes altos (80%) a pH 9.0 podría indicar que tal vez la cepa *Sii-25124* cuenta con mecanismos de tolerancia a pHs alcalinos o a otros medios adversos (Domínguez, comunicación personal).

Según la información teórica arrojada por el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de las amilasas de *Sii-25124* y de la predicción de algunas de sus características fisicoquímicas, si el punto isoeléctrico de la amilasa intracelular de 55.7 kDa está calculado de 5.15, sería probable que la actividad obtenida a pH 5.0 según el Gráfico 2 sea mayoritariamente debida a la amilasa asociada a membrana celular de 250 kDa. Sin embargo, el valor del punto isoeléctrico de la amilasa intracelular es muy cercano al de la amilasa de membrana plasmática, que es de 4.62 (Tabla 9) Probablemente la baja actividad obtenida en pH 5.0 haya sido únicamente debida a la amilasa de 250 kDa, cuya baja actividad podría ser a causa de que se encontró en un pH próximo a su punto isoeléctrico, siendo probablemente nula la participación de la amilasa intracelular.

En comparación con otras amilasas de bacterias ácido lácticas, las amilasas de *Sii-25124* tienen un intervalo amplio de pH en el que muestran una actividad de más del 100%, que es similar al que presenta la  $\alpha$ -amilasa extracelular de *S. bovis* JB1 (Tabla 19). En general, la estabilidad al pH que presentan otras amilasas de bacterias lácticas amilolíticas comprende un intervalo ácido, entre 5.0 a 6.0, siendo las amilasas extracelulares de *L. plantarum* A6 y *L. manihotivorans* LMG 18010 las que presentan estabilidad desde pH 4.0. La estabilidad a pHs ácidos en las amilasas de este tipo de bacterias debe ser importante debido a los ambientes ácidos que generan ellas mismas para colonizar y dominar su nicho. Es interesante que las amilasas de *Sii-25124* presenten baja actividad

a pH 4.0 y 5.0, debido justamente a la capacidad de las bacterias ácido lácticas de adaptarse a ambientes de hasta pH 3.0. Sin embargo, la presencia de *Sii-25124* en la etapa inicial de la fermentación de la bola de nixtamal, cuando el pH se encuentra entre 7.0 y 7.8 (Wacher *et al.*, 1993), puede ser consecuencia de su adaptación a dicho ambiente, y esto a su vez una posible razón por la que sus amilasas son estables en un intervalo diferente al de otras amilasas de bacterias lácticas amilolíticas, las cuales no presentan estabilidad a pHs alcalinos, (Tabla 19), siendo que las amilasas de *Sii-25124* aún presentan el 80% de actividad a pH 9.0. Estos resultados podrían sugerir que la participación de ambas amilasas en el proceso de fermentación del pozol son importantes para la prevalencia de *Sii-25124* en todas las etapas del proceso, ya que considerando las mesetas obtenidas del Gráfico 2, cabe la posibilidad de que una o ambas enzimas sean activas tanto al inicio de la fermentación cuando el pH no es ácido, como al final, cuando el pH de la masa se acidifica hasta valores de 4.6 (Wacher *et al.*, 1993).

Cabe mencionar que existe interés por amilasas con estabilidad a pHs alcalinos para procesos industriales, como para la producción de detergentes, debido a que aquellos producidos a base de enzimas son más eficientes que los sintéticos, además de que son biodegradables y amigables con el medio ambiente. Sin embargo, estos detergentes requieren de enzimas resistentes a medios alcalinos para poder funcionar adecuadamente (Dahiya y Rath, 2015). Así pues, las amilasas de *Sii-25124* podrían ser buenas candidatas para usarse en la producción de detergentes, para lo cual sería interesante caracterizarlas individualmente con el fin de ver cuál de ellas es más resistente a pHs alcalinos.

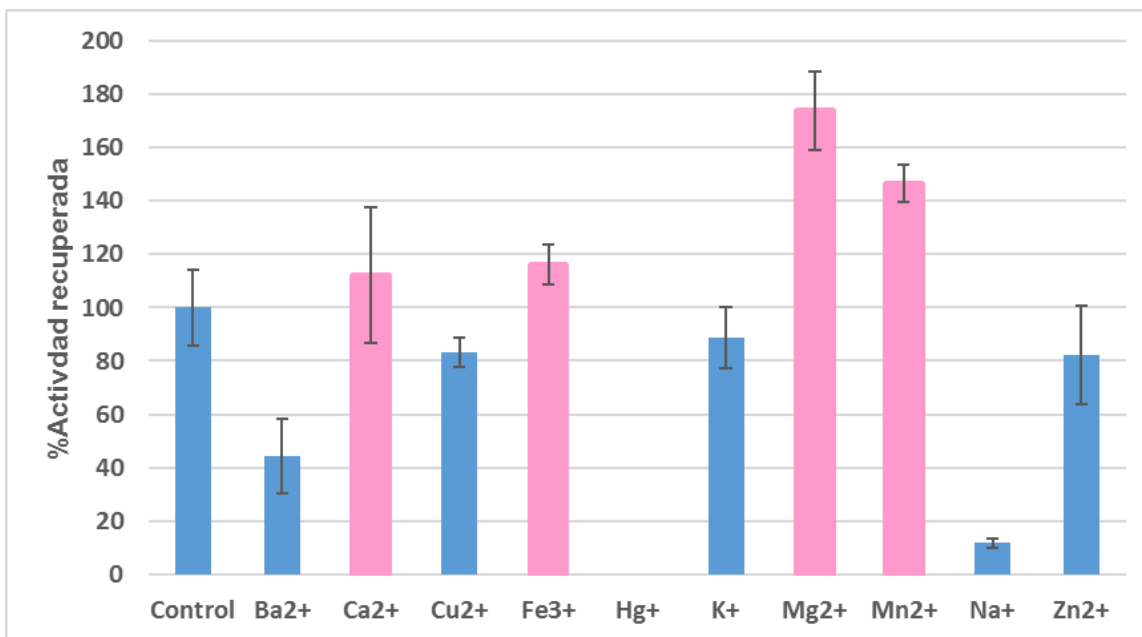
**Tabla 19.** Comparación de la estabilidad frente al pH de las amilasas de *Sii-25124* con amilasas provenientes de otras especies de bacterias amilolíticas

Especie	Enzima	Estabilidad	Inactivación	Referencia
<i>S. infantarius</i> 25124	Sobrenadante del lisado celular con dos amilasas	6.8-8.0	3.0	Este trabajo
<i>S. bovis</i> JB1	α-amilasa extracelular	5.5-8.5	---	Freer, 1993
<i>L. plantarum</i> A6	α-amilasa extracelular	4.5-5.5	3.0	Giraud <i>et al.</i> , 1993
<i>L. amylovarus</i> ATCC 33620	α-amilasa extracelular	5.0-6.0	2.0	Castillo <i>et al.</i> , 1993
<i>L. amylophilus</i> NRRL B-4437	α-amilasa extracelular	5.0-6.0	2.0	
<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010	α-amilasa extracelular	4.0-6.0	2.5	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
<i>B. cereus</i> HI.5	amilopolulanasa extracelular	2.0-10.0	1.0	Hii <i>et al.</i> , 2009

## Efecto de iones metálicos sobre la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*

Michas proteínas contienen sitios de unión para iones metálicos que contribuyen en su función. Los iones metálicos en las metaloenzimas o enzimas metaloactivadas actúan como catalizadores electrofílicos, estabilizando el aumento de la densidad electrónica generada durante las reacciones; así mismo, les permite adquirir mayor estabilidad en su conformación, lo cual puede verse reflejado en un aumento de su actividad enzimática (Prakash *et al.*, 2011). En general, las amilasas son metaloenzimas que requieren iones calcio para su actividad, integridad estructural y estabilidad (Nielsen *et al.*, 2003; Sudha, 2012); sin embargo, hay amilasas que no requieren iones Ca<sup>2+</sup> para presentar una actividad óptima, como las amilasas extracelulares de *S. bovis* JB1 y *L. plantarum* A6 (Freer, 1993 y Giraud *et al.*, 1993, respectivamente) o que requieren otro tipo de metal divalente,

como la amilasa de *L. amylophilus* NRRL B-4437, que se activa con iones  $Ba^{2+}$  (Castillo *et al.*, 1993) o la amilasa de *B. licheniformis* 2618, que se activa con  $Mg^{2+}$  (Divakaran *et al.*, 2011). Siendo así, se evaluó el efecto de diferentes iones en la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*, obteniéndose los resultados del Gráfico 3.



**Gráfico 3.** Actividad amilolítica recuperada del sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* en presencia de diferentes iones metálicos (10 mM). Barras azules: actividad del 0-100%; barras rosas: actividad > 100%. El control consistió en la medida de actividad amilolítica de las amilasas en el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* recién obtenido, realizando el ensayo a 37°C, pH 6.8 y sin agregar ningún ión divalente.

La actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124* se vio altamente favorecida con iones  $Mg^{2+}$ , lo que le confirió a las enzimas una actividad del 173.8% con respecto del control (100%). El segundo ión que favoreció la actividad de las amilasas fue el  $Mn^{2+}$  con 146.6%, seguido de  $Fe^{3+}$  (116%) y de  $Ca^{2+}$  (112%). En general la actividad de posiblemente ambas enzimas se vio inhibida por los iones  $Na^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ; mientras que ambas fueron inactivadas por el  $Hg^+$ ; sin embargo, la activación que se observó con los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  no se sabe si es porque una sola enzima fue favorecida y la otra no; o porque ambas lo son en diferente o la misma proporción. En este punto es importante recordar que en la secuencia de la amilasa de *Sii-25124* se encontró que el sitio de unión a cationes es característico de este tipo de enzimas y que pueden unir tanto iones  $Ca^{2+}$  como  $Mg^{2+}$  (Mikami *et al.*, 2006), por lo que este resultado confirmaría experimentalmente lo reportado para este tipo de enzimas, sugiriendo que el sitio de unión a catión en la amilasa de *Sii-25124* está más adecuado para  $Mg^{2+}$ . Además, es interesante que aunque el calcio sí mejoró la actividad de las amilasas del sobrenadante del lisado, el magnesio lo hizo en mayor medida. Considerando que la masa del pozol contiene cantidades significativas de calcio debido al proceso de nixtamalización, es posible que la actividad de las amilasas bajo estas condiciones no sea la óptima, lo que podría explicar por qué *Sii-25124* no se considera una cepa tan amilolítica como otras, como *L. plantarum* A6, aislada de raíces de yuca y cuya amilasa no requiere de  $Ca^{2+}$  para llevar a cabo su actividad (Giraud *et al.*, 1991 y 1993).

También cabe resaltar que en la secuencia de la amilasa citoplásmica de *Sii-25124* se identificó un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ , indicando que probablemente uno o ambos iones podrían activar su funcionamiento. El ensayo aquí realizado sugiere que el  $\text{Na}^+$  no es el ión para el que está adecuado el sitio de unión a catión en la  $\alpha$ -amilasa intracelular de *Sii-25124*.

La inactivación por iones  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  pudo deberse a su unión a posibles grupos sulfhidrilo en el sitio activo de las amilasas, llevando a su inactivación o a que estos iones compiten por la unión al sitio de unión a catión, llevando entonces a una inactivación por inhibición (Prakash *et al.*, 2011; Alnuaimi *et al.*, 2012). La inactivación de las amilasas por iones metálicos pesados es parte de la evidencia de que residuos de cisteína están presentes en el sitio activo de estas enzimas. Para las amilasas, la presencia de grupos sulfhidrilo libres son necesarios para su estabilidad, su comportamiento redox, para la unión de cofactores, para la nucleofilicidad y la actividad catalítica (Giles *et al.*, 2003; Bradwell, 2005). Siendo así, ya que los grupos tiol tienden a actuar como ligandos para los iones metálicos, es factible la unión de iones de metales pesados con la consecuencia de la inactivación por inhibición. Por otro lado, la inactivación por iones como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  pudo deberse a la desestabilización de la estructura de las enzimas por la reducción en la disponibilidad de moléculas de agua del medio, indicando que se podría tratar de una actividad amilolítica halosensible. Otras amilasas son capaces de resistir o incrementar su actividad por la presencia de cationes salinos, como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$ , como en las amilasas de *L. plantarum* A6 (Giraud *et al.*, 1993) y de *L. manihotivorans* LMG 18010 (Aguilar *et al.*, 2000).

Los iones que funcionaron como activadores para las amilasas de *Sii-25124*,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  también funcionan como activadores de amilasas como la de *L. plantarum* A6, cuya actividad aumenta con  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Giraud *et al.*, 1993) y la de *L. amylophilus* ATCC 33620, que también se activa con  $\text{Fe}^{3+}$  (Castillo *et al.*, 1993). Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  se reporta como el activador común para la mayoría de las amilasas, siendo pocas las que no se ven favorecidas por él, como la amilasa de *L. plantarum* A6 (Giraud *et al.*, 1993) y la de *L. amylovorus* ATCC 33620 (Castillo *et al.*, 1993), las cuales se inactivan ligeramente en presencia de dicho ión; mientras que existen amilasas que no se ven afectadas por él, como las de *S. bovis* JB1 (Freer, 1993) y de *Bacillus* sp. SMIA-2 (Carvalho *et al.*, 2008), cuya actividad permanece igual con o sin presencia del ión. La comparación de la afectación frente a iones metálicos en otras amilasas bacterianas se resume en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Comparación del comportamiento de amilasas de bacterias amilolíticas frente a iones metálicos.

Especie	Enzima	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	K <sup>+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	Referencia
<i>S. infantarius</i> 25124	lisado celular con dos amilasas	112%	173.8%	44.3%	83.3%	82.3%	116%	88.6%	146%	0.0%	Este trabajo
<i>S. bovis</i> 148	α-amilasa intracelular	--	--	--	30%	--	--	--	--	0.0%	Satoh <i>et al.</i> , 1997
<i>S. bovis</i> JB1	α-amilasa extracelular	100%	100%	100%	100%	100%	100%	---	81%	81%	Freer, 1993
<i>L. plantarum</i> A6	α-amilasa extracelular	95%	104%	103%	109%	107%	115%	114%	---	0.0%	Giraud <i>et al.</i> , 1993
<i>L. amylovorus</i> ATCC 33620	α-amilasa extracelular	87%	---	91%	89%	84%	71%	---	---	31%	Castillo <i>et al.</i> , 1993
<i>L. amylophilus</i> NRRL B-4437	α-amilasa extracelular	117%	---	120%	112%	107%	106%	---	---	35%	
<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010	α-amilasa extracelular	101%	94%	103%	51%	103%	8%	104%	99%	2%	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
<i>L. amylophilus</i> GV6	Amilasa	130%	---	76%	55%	90%	60%	---	---	---	Vishnu <i>et al.</i> , 2006
	Pululanasa	110%	---	88%	0.0%	60%	32%	---	---	---	
<i>Bacillus</i> sp SMIA-2	α-amilasa extracelular	100%	95%	25%	10%	70%	---	60%	25%	---	Carvalho <i>et al.</i> , 2008
<i>B. cereus</i> HI.5	amilopululanasa extracelular	172.5%	6.4%	---	0.5%	3.5%	4.9%	---	64.5%	---	Hii <i>et al.</i> , 2009

### Efecto del sustrato en la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*

Con el fin de tener una idea sobre la especificidad por sustrato y el comportamiento de la actividad amilolítica de las amilasas frente a almidón y amilopectina (sustrato ramificado), así como frente a distintas concentraciones de éstos, se realizaron ensayos para obtener esbozos de curvas de actividad enzimática frente al tiempo. Normalmente, las amilasas se evalúan frente a distintos sustratos como almidón soluble, almidón insoluble, amilosa, amilopectina, glucógeno, pululano y otros polisacáridos (Castillo *et al.*, 1993; Vishnu *et al.*, 2006). En la presente investigación los sustratos evaluados para las amilasas de *Sii-25124* fueron almidón soluble y amilopectina con el fin de tener una idea sobre su comportamiento frente al primero, que funge como sustrato principal para las amilasas, y saber si posee actividad sobre sustratos ramificados. A continuación, se reportan los resultados obtenidos así como su respectivo análisis.

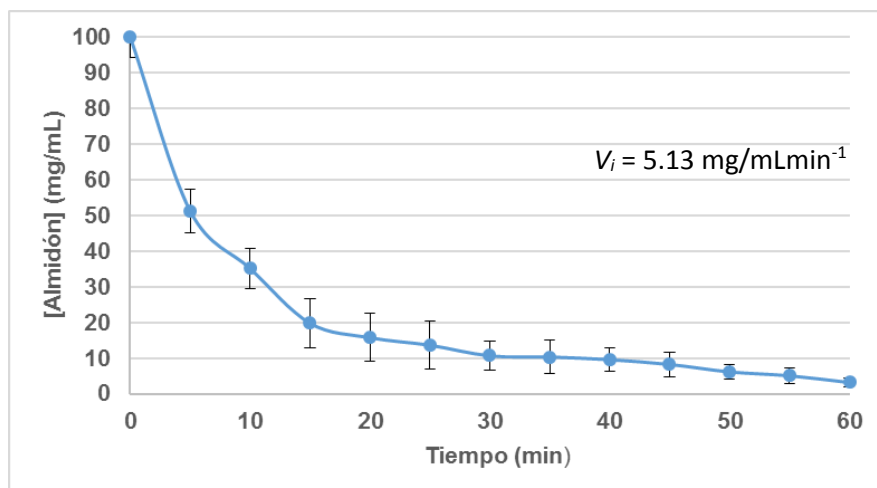
### Curso temporal de la hidrólisis del almidón y la producción de azúcares reductores a partir de almidón por las amilasas de *Sii-25124*

Se realizó una medición simultánea de la degradación del almidón y la producción de azúcares reductores de las amilasas de *Sii-25124*. Según se observa en el Gráfico 4, al hidrolizar 100 mg/mL de almidón inicial, las amilasas de *Sii-25124* presentan una velocidad de 5.13 mg/mL de almidón

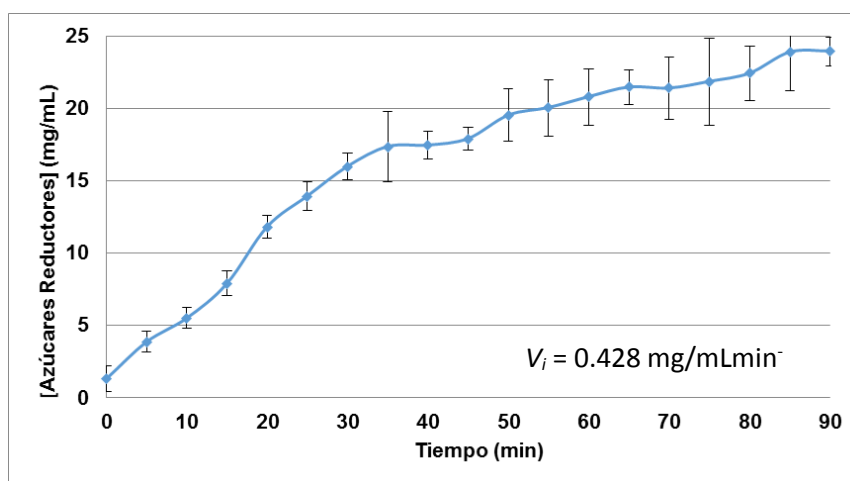
degradado por minuto durante los primeros 15 minutos de reacción. Según se observa, las amilasas son capaces de degradar la mitad del almidón inicial presente en tan sólo cinco minutos. Después de los primeros cinco minutos la degradación comienza a disminuir: en los 5 minutos subsiguientes (10 minutos totales de reacción) la concentración de almidón se reduce de  $51.3 \pm 6.2$  mg/mL a  $35.2 \pm 5.7$  mg/mL y en los siguientes 5 minutos (15 minutos totales de reacción) se reduce a 19.8 mg/mL, manteniéndose una reducción de 16 mg/mL de almidón en ambos tiempos. Pasados los 15 minutos, la degradación comienza a ser más lenta, reduciéndose entre 3-1 mg/mL de almidón por cada cinco minutos, hasta que a los 60 minutos se obtuvo una concentración final de  $3.2 \pm 1.3$  mg/mL de almidón.

Por otro lado, en cuanto a la producción de azúcares reductores (Gráfico 5) se observó una velocidad baja en comparación con la degradación de almidón. A partir de 100 mg/mL del sustrato, las amilasas de *Sii-25124* produjeron azúcares reductores a una velocidad de  $0.428$  mg/mLmin<sup>-1</sup> durante los primeros 15 minutos de reacción. Después, el producto sigue acumulándose de forma gradual hasta mantenerse casi sin cambios al finalizar la reacción a los 90 minutos, llegándose a producir  $24 \pm 1$  mg/mL de azúcares reductores.

El patrón de hidrólisis del almidón y de producción de azúcares reductores que presentaron las amilasas de *Sii-25124* es típico de enzimas  $\alpha$ -amilasas: un rápido descenso de la concentración de almidón en conjunto con una producción baja de azúcares, lo que indica la actividad de una endoenzima (Giraud *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2000). Es posible que debido a un efecto sinérgico entre ambas amilasas presentes en el sobrenadante del lisado es que se haya presentado este comportamiento, ya que la hidrólisis del almidón (Gráfico 4) pareció ser más alta en comparación con la que llevan a cabo otras amilasas de bacterias lácticas amilolíticas, como la de *L. plantarum* A6, que reduce la concentración de almidón de 8 g/L a 6.5 g/L aproximadamente en 5 minutos (Giraud *et al.*, 1993); mientras que las amilasas de *Sii-25124* reducen a la mitad la concentración inicial del sustrato en el mismo tiempo. Por otro lado, la actividad de las amilasas es comparable con la de la amilasa de *L. manihottivorans* LMG 18010 que reduce la concentración del sustrato hasta casi 60% de la concentración inicial (Aguilar *et al.*, 2000). Sin embargo, la velocidad de reacción de cada amilasa por separado debe ser estudiada para poder compararlas entre ellas y con otras amilasas de otras bacterias amilolíticas.



**Gráfico 4.** Curso temporal de la hidrólisis del almidón por las amilasas de *Sii-25124* usando el método de extinción del complejo almidón-yodo. La curva es resultado de tres réplicas independientes. La velocidad inicial que se muestra fue calculada para los primeros 15 minutos de reacción.

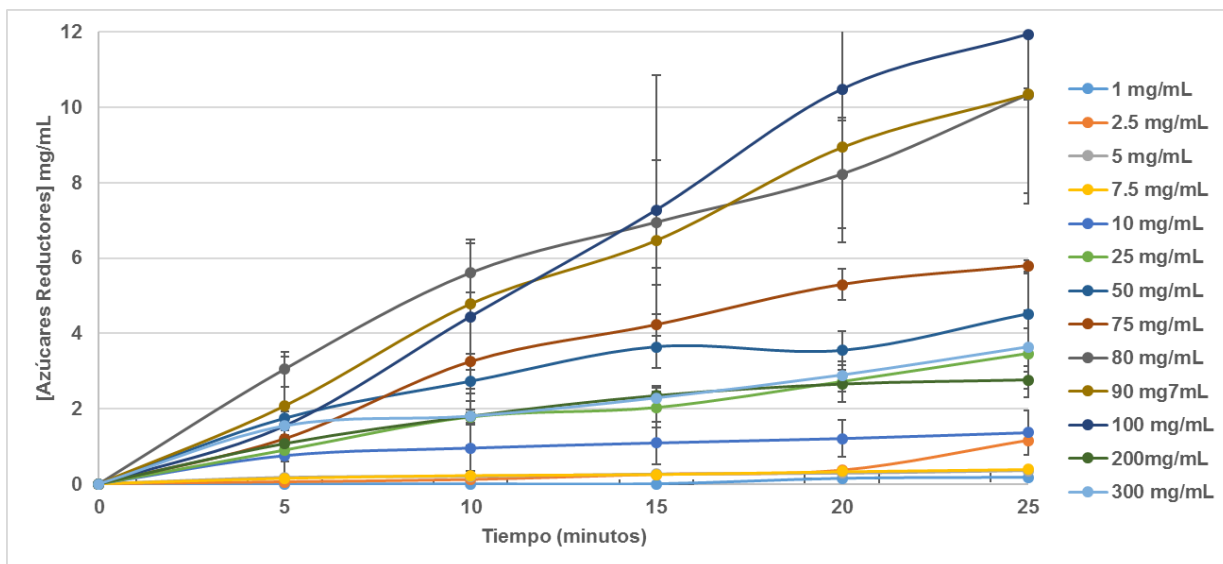


**Gráfico 5.** Curso temporal de la producción de azúcares reductores por las amilasas de *Sii-25124* usando almidón soluble como sustrato. Los azúcares reductores se cuantificaron por el método de DNS. La curva es resultado de tres réplicas independientes. La velocidad inicial que se muestra se calculó para los primeros 15 minutos de reacción.

### Efecto de diferentes concentraciones de almidón sobre la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124*

Se evaluó el comportamiento de las amilasas de *Sii-25124* ante diferentes concentraciones de almidón durante los primeros 25 minutos de reacción. Se encontró que las amilasas comienzan a generar azúcares reductores de forma importante a partir de 10 mg/mL de almidón en el medio de reacción, y dicha producción aumenta conforme aumenta la concentración de sustrato presente (Gráfico 6). De 1 a 7.5 mg/mL de almidón, la producción de azúcares reductores fue casi despreciable; sin embargo, ya con cantidades más altas, la producción aumentó notablemente: con

10 mg/mL la producción alcanzó un máximo de  $1.4 \pm 0.6$  mg/mL tras los 25 minutos. Con concentraciones de 25 a 75 mg/mL de almidón, la producción alcanzó máximos entre 3.5-5.8 mg/mL, pero esta producción se vio visiblemente aumentada al crecer la concentración de almidón a 80 mg/mL, ya que se produjeron  $10.3 \pm 2.6$  mg/mL de azúcares reductores a los 25 minutos. Después, con 90 y 100 mg/mL la producción inicial se redujo pero después aumentó hasta  $10.3 \pm 2.6$  mg/mL y  $11.9 \pm 4.5$  mg/mL, respectivamente. Finalmente, las concentraciones de 200 y 300 mg/mL redujeron notablemente la velocidad de reacción de las amilasas, alcanzando sólo 2.7 a 3.6 mg/mL a los 25 minutos (Gráfico 6), mostrándose una posible inhibición por sustrato.



**Gráfico 6.** Producción de azúcares reductores por parte de las amilasas de *Sii-25124* incubando en diferentes cantidades de almidón. Cada curva es resultado de tres réplicas experimentales.

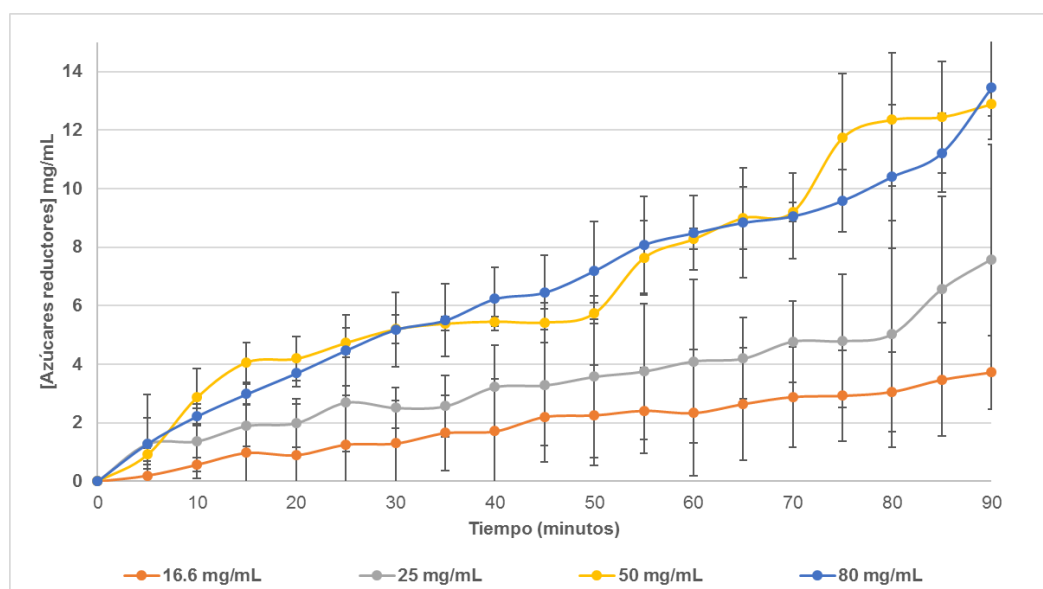
Del Gráfico 6 se observa que a partir de concentraciones de almidón de 200 mg/mL hay una reducción importante de la velocidad, lo que indicaría una inhibición por sustrato. Este tipo de inhibición implica que la curva de velocidad de una reacción enzimática se eleva hasta un máximo conforme la concentración de sustrato incrementa y luego desciende a cero o a una asíntota diferente de cero (Reed *et al.*, 2010). Se estima que este fenómeno se presenta en aproximadamente un 20% de las enzimas (Chaplin y Bucke, 1990; Reed *et al.*, 2010). La inhibición por sustrato puede darse porque las enzimas pueden contar con sitios especiales en los que una segunda molécula de sustrato puede unirse y actuar como inhibidor alostérico, lo cual tendría un papel en la regulación de vías metabólicas (Reed *et al.*, 2010). Es interesante que las amilasas de *Sii-25124* hayan presentado inhibición por sustrato, ya que podría estar indicando mecanismos de regulación metabólica presentes en esta cepa ante concentraciones muy elevadas de almidón, lo cual tal vez pudiera estar relacionado con una acumulación excesiva de oligosacáridos de menor tamaño en el exterior celular. A partir de este comportamiento de inhibición por sustrato se puede intuir que las amilasas no muestran un comportamiento Michaeliano, lo cual es lo esperado dado que no se evaluó su cinética de forma individual. El cálculo de constantes cinéticas a partir de un gráfico de dobles recíprocos no se sugiere debido a que arrojaría valores erróneos sobre la afinidad y la



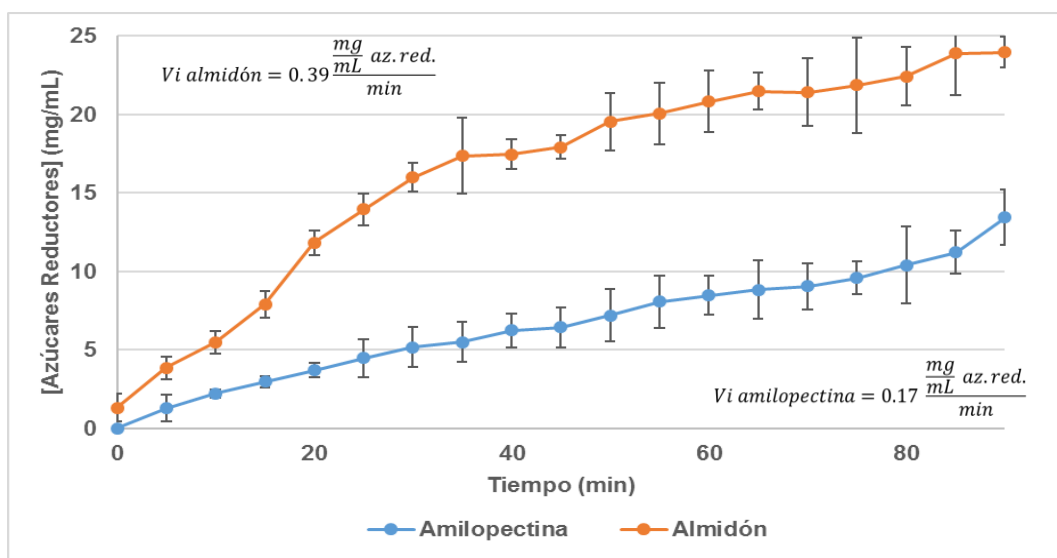
velocidad máxima de las amilasas de *Sii*-25124. Sin embargo, los resultados obtenidos con respecto a los cambios en la velocidad frente a diferentes concentraciones de sustrato son un primer esbozo en cuanto al estudio de estas amilasas. Existen los datos cinéticos de otras amilasas de bacterias lácticas amilolíticas, como el de la  $\alpha$ -amilasa de *L. plantarum* A6, que es de 2.38 mg/mL (Giraud *et al.*, 1993), el de la amilasa de *L. plantarum* L137 de 4 mg/mL (Olympia *et al.*, 1995) o el de la  $\alpha$ -amilasa extracelular de *S. bovis* JB1 de 0.88 mg/mL (Freer, 1993). Estos reportes podrían dar una noción respecto a las  $K_m$ s esperadas para las amilasas de *Sii*-25124.

### Curso temporal de la producción de azúcares reductores por las amilasas de *Sii*-25124 a partir de amilopectina

Se estudió la actividad de las amilasas de *Sii*-25124 sobre la amilopectina, un sustrato ramificado con enlaces  $\alpha(1-6)$  en cada 20-30 residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha(1-4)$ . Las amilasas de *Sii*-25124 tuvieron, a partir de la concentración más baja de amilopectina probada (16.6 mg/mL), una velocidad de 0.05 mg/mLmin<sup>-1</sup> durante los primeros 25 minutos de reacción. La concentración de azúcares reductores no cambió mucho en los tiempos subsecuentes, hasta que generó un máximo de 3.7±1.2 mg/mL a los 90 minutos de reacción. Después, con 25 mg/mL de amilopectina, durante los primeros 25 minutos de reacción alcanzó una velocidad de 0.09 mg/mLmin<sup>-1</sup>. Generando 7.6±3.9 mg/mL a los 90 minutos de reacción. Con 50 mg/mL de amilopectina se obtuvo 0.2 mg/mLmin<sup>-1</sup> a los 25 minutos hasta alcanzar 12.9±0.4 mg/mL a los 90 minutos de reacción. Finalmente, con 80 se produjeron 13.4±1.8 mg/mL al final del tiempo de reacción (Gráfico 7). La velocidad de producción durante los primeros 25 minutos fue de 0.17 mg/mLmin<sup>-1</sup>, notablemente más pequeña que la obtenida para 80 mg/mL de almidón. En el Gráfico 8 se observa que la producción de azúcares reductores a partir de 80 mg/mL amilopectina es notoriamente más lenta en comparación con la producción a partir de 80 mg/mL de almidón.



**Gráfico 7.** Producción de azúcares reductores por parte de las amilasas de *Sii*-25124 incubando en diferentes concentraciones de amilopectina. Cada curva es resultado de tres réplicas experimentales.



**Gráfico 8.** Cursos temporales de la producción de azúcares reductores a partir de almidón (naranja) y amilopectina (azul) a 80 mg/mL por parte de las amilasas de *Sii-25124*. Las velocidades iniciales que se presentan fueron calculadas a los 25 minutos de reacción.

De la secuenciación realizada a las amilasas presentes en el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* se descubrió que una de las amilasas de esta cepa podría tratarse de una amilopululanasa de 246.32 kDa, mientras que la otra de una  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de 55.76 kDa. Se sabe que las amilopululanosas son capaces de hidrolizar los enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$  en pululano, almidón, amilosa y amilopectina (Hii *et al.*, 2012), reportándose que los productos de la hidrólisis de almidón por parte de estas enzimas son glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (Vishnu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Nisha y Satyanarayana, 2013a), presentando bajas concentraciones de maltosa y glucosa, además de que la acción sobre almidón y amilopectina es muy lenta debido a la baja afinidad por los enlaces  $\alpha(1-4)$ ; estas características, aunadas a la acción sobre pululano, son indicios de una actividad endo-amilopululanolítica (Hii *et al.*, 2009). La baja velocidad de hidrólisis de las amilasas de *Sii-25124* frente a la amilopectina podría ser aparente, debido a que las dos enzimas se evaluaron juntas y el efecto observado sobre cada sustrato es una combinación de las características de ambas enzimas frente a cada sustrato. En general, el efecto de la inactividad frente enlaces  $\alpha(1-6)$  por parte de la  $\alpha$ -amilasa, aunado a una posible baja afinidad por los enlaces  $\alpha(1-4)$  por parte de la amilopululanasa, pudieron ser los causantes de una velocidad menor frente a la amilopectina en comparación a la velocidad frente a almidón; sin embargo, sería necesario un análisis de los productos de reacción frente a ambos sustratos como una forma de comprobar la actividad frente a enlaces  $\alpha(1-4)$  y enlaces  $\alpha(1-6)$ , ya que dependiendo del tipo y concentración de oligosacáridos producidos a diferentes tiempos de reacción es posible corroborar actividades endo-amilolíticas y endo-amilopululanolíticas (Taniguchi y Honda, 2013). Así mismo, la caracterización de la actividad de ambas enzimas frente al pululano sería otra manera más de corroborar sus funciones.

## CONCLUSIONES

---

La realización de este trabajo llevó al descubrimiento de que la actividad amilolítica de *Sii-25124*, la cepa presente en todas las etapas de la fermentación del pozol, radica en dos enzimas amilasas: una amilopululanasa de 246.3 kDa asociada a membrana celular con la posible capacidad de unirse e hidrolizar tanto sustratos ramificados como no ramificados y una  $\alpha$ -amilasa citoplásmica de 55.7 kDa, con la capacidad de hidrolizar sustratos no ramificados.

Estos hallazgos podrían sugerir que la participación de *Sii-25124* es importante al inicio de la fermentación de la masa nixtamalizada del pozol, debido a la producción de su amilasa asociada a membrana celular, que dada su posible actividad, no sólo sobre enlaces  $\alpha(1-4)$ , sino probablemente también sobre enlaces  $\alpha(1-6)$  y sobre un almidón desestructurado pero insoluble, podría generar los oligosacáridos suficientes para que otras bacterias lácticas no amilolíticas encuentren las condiciones para colonizar el medio y llevar a término la fermentación del pozol.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Agati, V.; Guyot, J.P.; Talamod, P. y Hounhouigan, D.J. (1998) **Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin.** *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 85, pp. 512-520.
- Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J.P. (2000) **Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, an amylolytic lactic acid bacterium.** *Enzyme and Microbial Technology*, 27, pp. 406-412.
- Alnuaimi, Maitha M.; Saeed, Ibtesam A. y Ashraf, S. Salman (2012) **Effect of various heavy metals on the enzymatic activity of *E. coli* alkaline phosphatase.** *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 8, No. 1, pp. 47-59.
- Altermann, E.; Russell, W.M.; Azcarate-Peril, M.A.; Barrangou, R.; Buck, B.L.; McAuliffe, O.; Souther, N.; Dobson, A.; Duong, T.; Callanan, M.; Lick, S.; Hamrick, A.; Cano, R. y Klaenhammer, T.R. (2005) **Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 102, No. 11, pp. 3906-3912.
- Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J.P. (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*, Vol. 65, No. 12 pp. 5464–5473.
- Aygan, Ashabil; Arikian, Burhan; Korkmaz, Hatice; Dinçer, Sadik y Çolak, Ömer (2008) **Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68.** *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 39, pp. 547-553.
- Bae, Taeok y Schneewind, Olaf (2003) **The YSIRK-G/S motif of Staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing.** *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 9, pp. 2910-2919.
- Bello-Pérez, Luis A.; Flores-Silva, Pamela C.; Aagama-Acevedo, Edith; Figueroa-Cárdenas, Juan de Dios; López-Valenzuela, José A. y Campanella, Osvaldo H. (2014) **Effect of the nixtamalization with calcium carbonate on the indigestible content and starch digestibility of corn tortilla.** *Journal of Cereal Science*. No. 60, pp. 421-425.
- Ben Omar, N. y Ampe F. (2000) **Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 9 pp. 3664–3673.
- Benhamed, Faiza H.; Gopinath, Gopal R.; Harbottle, Heather; Cotta, Michael A.; Luo, Yan; Henderson, Carol; Teri, Plona; Soppet, Daniel; Rasmussen, Mark; Whitehead, Terence R.; Davidson, Maureen (2014) **Draft genome sequences of *Streptococcus bovis* strains ATCC 33317 and JB1.** *Genome Announcements*, Vol. 5, Tomo 5, pp. 1012-1014.

Boel, E.; Brady, L.; Brozowski, A.M.; Derewenda, Z.; Dodson, G.G.; Jensen, V.J.; Petersen, S.B.; Swift, H.; Tim, L.; Woldike, H.F. (1990) **Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus***. *Biochemistry*, Vol. 29, No.26, pp. 6244-6249.

Boettcher, B. y De La Lande, Frances A. (1969) **Electrophoresis of human salivary amylase in gel slabs**. *Analytical Biochemistry*, Vol. 28, pp. 510-514.

Bohinski, Robert C. (1991) **“Enzimas” y “Carbohidratos”** en *Bioquímica*, 5ª ed., Pearson Education, México, pp.179 y 397.

Bolotin, A.; Quinquis, B.; Renault, P.; Sorokin, A.; Ehrlich, S.D.; Kulakauskas, S.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Mazur, M.; Pusch, G.D.; Fonstein, M.; Overbeek, R.; Kyprides, N.; Purnelle, B.; Prozzi, D.; Ngui, K.; Masuy, D.; Hancy, F.; Burteau, S.; Boutry, M.; Delcour, J.; Goffeau, A. y Hols, P. (2004) **Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus***. *National Biotechnology*, Vol. 22, No. 12, pp. 1554-1558.

Bondos, Sarah E. y Bicknell, Alicia (2003) **Detection and prevention of protein aggregation before, during and after purification**. *Analytical Biochemistry*, Vol. 316, pp. 223-231.

Brock T.D.; Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (2003) **“La diversidad procariótica: bacteria”** en *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Pearson-Prentice Hall, España, pp.420-422.

Brown, Terry L.; Yet, Mei-Gang y Wold, Finn (1982) **Substrate-containing gel electrophoresis: sensitive detection of amylolytic, nucleolytic and proteolytic enzymes**. *Analytical Biochemistry*, Vol. 122, No. 1, pp. 164-172.

Cabeza Herrera, E.A. (2006) **Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica**. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, España.

Castillo Pompeyo, C.; Suárez Gómez, M.; Gasparian, S.; Morlon-Guyot, J. (1993) **Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, pp. 266-269.

Cárdenas, C.; Barkla, B.J.; Wachter, C.; Delgado-Olivares, L. y Rodríguez-Sanoja, R. (2014) **Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food**. *Journal of Proteomics*, Vol. 111, pp. 139-147.

Carvalho, Raquel Vieira de; Ribeiro Côrrea, Thamy Livia; Matos da Silva, Júlia Caroline; Coutinho de Oliveira Mansur, Luciana Ribeiro y Leal Martins, Meire Lelis (2008) **Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.*** *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 39, pp. 102-107.

Cazenave, C. y Toulmé, J.J. (2001) **“Gel renaturation assay for ribonucleases”** en: *Methods in Enzymology*, Vol. 341 Academic Press. pp. 113-117.

Chaplin, Martin y Bucke, Christopher (1990) **“Enzyme inhibition”** en *Enzyme Technology*. Cambridge University Press [En línea] Cambridge, Reino Unido. Disponible en: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/inhibition.html> [13 Septiembre, 2017]

Chaplin, Martin (2016) **“Starch”** en *Water Structure And Science* [En línea] London South Bank University. Londres. Disponible en: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/starch.html> [Fecha de consulta: 2 de Junio, 2017].

Chen, Jen-Tao; Chen, Ming-Chu; Chen, Li-Lin y Chu, Wen-Shen (2001) **Structure and expression of an amylopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus* TS-23**. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, No. 33, pp. 189-199.

Dahiya, P. y Rathi, B. (2015) **Characterization and application of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive**. *International Food Research Journal*, Vol. 22, No. 3, pp. 1293-1297.

Davies, Gideon y Henrrisat, Bernard (1995) **Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases**. *Structure*, Vol. 3, Tomo 9, pp. 853-859.

De Man, J.C.; Rogosa, M. y Sharpe, M. Elisabeth (1960) **A medium for the cultivation of *Lactobacilli***. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 23, Tomo 1, pp. 130-135.

Díaz Ruiz, Gloria (2003) **Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol**. Tesis Doctoral. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Díaz-Ruiz, G.; Guyot, J.P.; Ruiz-Terán, F.; Morlon-Guyot, J. y Wachter, C. (2003a) **Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a mexican fermented maize beverage**. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 8 pp. 4367-4374.

Díaz-Ruiz, Gloria; Guyot, Jean-Pierre; Ruiz-Terán, Francisco; Morlon-Guyot, Juliette y Wachter, Carmen (2003b) **Amyolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementary foods?** 2nd International Workshop of Food Health Approaches For A Healthy Nutrition. Ouagadougou, 23-28th November, 2003.

Divakaran, Dibu; Chandran, Aswathi y Chandran, R. Pratap (2011) **Comparative study on production of a  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* strains**. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 42, No. 4, pp. 1397-1404.

Dixon, B.; Abbott, P.J.; Verger, P.; Pascal, G. y DiNovi M. (2008) **Pullulan. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations** [En línea] International Programme on Chemical Safety. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je05.pdf> [Fecha de consulta: 5 de Junio, 2017].

Escalante, A.; Wachter, C. y Farrés A. (2001) **Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis**. *International Journal of Food Microbiology* Vol. 64, pp.21–31.

ExpASy Bioinformatics Resource Portal (2017) **ProtParam** [En línea] Swiss Institute of Bioinformatics. Disponible en: <https://web.expasy.org/protparam/> [Fecha de consulta: 29 Noviembre 2017]

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1993) **“Composición química y valor nutritivo del maíz”** en *El maíz en la Nutrición Humana*. Colección FAO: Alimentación y Nutrición No. 25. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents> [12 Mayo 2017].

Ferrando, Maria Laura; Fuentes, Susana; de Greeff, Astrid; Smith, Hilde y Wells, Jerry M. (2010) **ApuA, a multifunctional  $\alpha$ -glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus.** *Microbiology*, Vol. 156, pp. 2818-2828.

Flores Ramírez, Eleonora (2008) “Pozol, una bebida fermentada tradicional de México” en *Cienciorama* [En línea] **Dirección General de Divulgación de la Ciencia de la Universidad Nacional Autónoma de México.** México. Disponible en: <http://www.cienciorama.unam.mx/#!titulo/177/?pozol--una-bebida-fermentada-tradicional-de-mexico> [3 de Mayo 2017].

Fogarty, W.M. (1983) **“Microbial amylases”** en *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Editado por Fogarty, W.M. Applied Science Publishers, Londres, Inglaterra, pp. 1-92.

Fossi, Bertrand Tatsinkou y Tavea, Frédéric (2013) **“Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA 19 in fermentation for simultaneous production of thermostable  $\alpha$ -amylase and lactic acid”** en *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Capítulo 27. Editado por Kongo, Marcelino, INTECH, pp. 633-659.

Freundlieb, Sabine y Boos, Winfried (1985)  **$\alpha$ -Amylase of *Escherichia coli*, mapping and coding of the structural gene, *malS*, and identification of its product as a periplasmic protein.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 261, No. 6, pp. 2946-2953.

Freer, Shelby N. (1993) **Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* JB1.** *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 59, No.5. pp. 1398-1402.

Fujimoto, Zui; Takase, Kenji; Doui, Nobuko; Momma, Mitsuru; Matsumoto, Takashi y Mizuno, Hiroshi (1998) **Crystal structure of a catalytic-site mutant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose.** *Journal of Molecular Biology*, Vol. 277, pp. 393-407.

García Ramírez, Benjamín; Aguilera Ruiz, Paola; Castro Hernández, Ricardo y Rodríguez Sanoja, Romina (2012) **Estructura y función de los dominios de fijación al almidón.** *BioTecnología*, Vol 16, No. 4, pp. 11-23.

García-Villanova Ruiz, Belén y Guerra Hernández, Eduardo Jesús (2010) **“Cereales y productos derivados”** en *Tratado de Nutrición*. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Editado por: Gil Hernández, Ángel. Editorial Médica Panamericana. 2ª ed., Madrid, España, pp. 100-102.

Giles, N.M.; Giles, G.I. y Jacob, C. (2003) **Multiple roles of cysteine residue in biocatalysis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 300, pp. 1-4.

Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; Deboy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Dodson, R.J.; Daugherty, S.C.; Madupu, R.; Angiuoli, S.V.; Durkin, A.S.; Haft, D.H.; Vamathevan, J.; Khouri, H.; Utterback T.; Lee, C.; Dimitrov, G.; Jiang, L.; Qin, H.; Weidman, J.;

Tran, K.; Kang, K.; Hance, I.R.; Nelson, K.E. y Fraser, C.M. (2005) **Insights of evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain.** *Journal of Bacteriology*, Vol. 187, No. 7, pp. 2426-2438.

Giraud, E.; Brauman, A.; Keleke, S.; Lelong, B. y Raimbault, M. (1991) **Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36, pp. 379-383.

Giraud, E.; Gosselin, L.; Marin B.; Parada J.L. y Raimbault, M. (1993) **Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6.** *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 75, pp. 276-282.

Giraud, Eric; Champailier, Alain; Raimbault, Maurice (1994) **Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*.** *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60, No. 12, pp. 4319-4323.

Giraud, Eric y Cuny, Gerard (1997) **Molecular characterization of the  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin.** *Gene*. Vol. 198 pp. 149-157.

Guillén, D.; Santiago, M.; Linares, L.; Pérez, R.; Morlon, J.; Ruiz, B.; Sánchez, S. y Rodríguez-Sanoja, R. (2007) **Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 12, pp. 3833-3837.

Guillén, Daniel; Sánchez, Sergio y Rodríguez-Sanoja, Romina (2010) **Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 85, pp. 1241-1249.

Gupta, Rani; Gigras, Paresh; Mohapatra, Harapriya; Goswami, Vineet Kumar y Chauhan, Bhavna (2003). **Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective.** *Process Biochemistry*, Vol. 38, pp. 1599-1616.

Hamad, S.H.; Dieng, M.C.; Ehrmann, M.A. y Vogel, R.F. (1997) **Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough.** *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 83, pp. 764-770.

Hatada, Yuji; Igarashi, Kazuaki; Ozaki, Katzuya; Ara, Katsutoshi; Hitomi, Jun; Kobayashi, Tohru; Kawai, Shuji; Watabe, Tomoyoshi e Ito, Susumu (1996) **Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages in polysaccharides at different active sites.** *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 39, pp. 24075-24083.

Henrissat, Bernard (1991) **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochemical Journal*, Vol. 280, pp. 309-316.

Henrissat, Bernard y Bairoch, Amos (1993) **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochemical Journal*, Vol. 293, pp. 781-788.



Henrissat, Bernard; Callebaut, Isabelle; Fabrega, Sylvie; Lehn, Pierre; Mornon, Jean-Paul y Davies, Gideon (1995) **Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 92, pp. 7090-7094.

Henrissat, Bernard y Bairoch, Amos (1996) **Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.** *Biochemical Journal Letters*, Vol. 316, pp. 695-696.

Hii, Siew Ling; Ling, Tau Chuan; Mohamad, Rosfarizan y Bin Ariff, Arbakariya (2009) **Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* HI.5.** *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 5, No. 4, pp. 170-179.

Hii, Siew Ling; Tan, Jo Shun; Ling, Tau Chuan y Bin Ariff, Arbakariya (2012) **Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications.** *Enzyme Research*, Vol. 2012 [En línea] Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/er/2012/921362/> [Fecha de consulta: 6, Diciembre 2017].

Hoseney, R. Carl (1991) **“Almidón en los cereales”** en *Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales*, Editorial Acribia, España, pp. 31-51.

Hu, X. y Beeton, C. (2010) **Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography.** *Journal Of Visualized Experiments*, Vol. 45 [En línea] Disponible en: <https://www.jove.com/pdf/2445/jove-protocol-2445-detection-of-functional-matrix-metalloproteinases-by-zymography> [Fecha de consulta: 1 Agosto 2017].

Hwang, Kwan Yeon; Song, Hyun Kyun; Chang, Changsoo; Lee, Jungkyu; Lee, Suk Yeong; Kim, Kyeong Kyu; Choe, Senyon; Sweet, Robert M. y Suh, Se Won (1997) **Crystal structure of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* refines at 1.7 Å resolution.** *Molecules and Cells*, Vol. 7, No. 2, pp. 251-258.

Janeček, Štefan (1995) **Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence región.** *FEBS Letters*, Vol. 377, pp. 6-8.

Janeček, Štefan (2002) **How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family?** *Biologia, Bratislava*, Vol. 57, Supl. 11, pp. 29-41.

Janeček, Štefan; Svensson, Brite y McGregor E. Ann (2007) **A remote but significant homology between glycoside hydrolase clan GH-H and family GH31.** *FEBS Letters*, Vol. 581, pp. 1261-1268.

Janeček, Štefan; Majzlova, Katarina; Svensson, Birte y MacGregor, Ann E. (2017) **The starch-binding domain family CBM41-An in silico analysis of evolutionary relationships.** *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* [En línea] Wiley Online Library. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.25309/abstract> [Fecha de consulta: 12 de Junio, 2017].

Kakefuda, Genichi y Duke, Stanley H. (1984) **Electrophoretic transfer as a technique for the detection and identification of plant amylolytic enzymes in polyacrylamide gels.** *Plant Physiology*, Vol. 75, pp. 278-280.

Kanai, Ryuta; Haga, Keiko; Akiba, Toshihiko; Yamane, Kunio y Harata, Kazuaki (2004) **Biochemical and crystallographic analyses of maltohexaose-producing amylase from alkalophilic *Bacillus sp.* 707.** *Biochemistry*, Vol. 43, pp. 14047-14056.

Kang, Jinho; Park, Kyung-Min; Choi, Kyoung-Hwa; Park, Cheon-Seok; Kim, Go-Eun; Kim, Doman y Cha, Jaeho (2011) **Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pulullanase from *Thermotoga neapolitana*.** *Enzyme and Molecular Technology*, Vol. 48, Tomo 3, pp. 260-266.

Kanpiengjai, Apinun; Nguyen, Thu-Ha; Haltrich, Dietmar; Khanongnuch, Chartchai (2017) **Expression and comparative characterization of complete and C-terminally truncated forms of saccharifying  $\alpha$ -amylase from *Lactobacillus plantarum* S21.** *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 103, pp. 1294-1301.

Kim, Jong-Hyun; Sunako, Michihiro; Ono, Hisayo; Murooka, Yoshikatsu; Fukusaki, Eiichiro y Yamashita, Mitsuo (2008) **Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 106, No.5, pp. 449-459.

Kim, Jong-Hyun; Sunako, Michihiro; Ono, Hisayo; Murooka, Yoshikatsu; Fukusaki, Eiichiro y Yamashita, Mitsuo (2009) **Characterization of the C-terminal truncated of amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 107, No. 2, pp. 124-129.

Knapp, Stefan; Rüdiger, Andrea; Antranikian, Garabed; Jorgensen, Per L. y Ladenstein, Rudolf (1995) **Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an amylopullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei*.** *Proteins: Structure, Function and Genetics*, Vol. 23, pp. 595-597.

Koropatkin, Nicole M. y Smith, Thomas J. (2010) **SusG: A unique cell-membrane-associated  $\alpha$ -amylase from a prominent human gut symbiont targets complex starch molecules.** *Structure*, Vol. 18, pp. 200-215.

Kumar, Vikash (2011) **Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members.** *Bioinformatics*. Vol. 6, No. 2, pp. 61-63.

Kuriki, Takashi e Imanaka, Tadayuki (1999) **The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.87, No.5, pp. 557-565.

Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.** *Nature* 227, pp. 680-685.

Larson, Steven B.; Greenwood, Aaron; Cascio, Duilio; Day, John y McPherson, Alexander (1994) **Refined molecular structure of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase at 2.1 Å resolution.** *Journal of Molecular Biology*, Vol. 235, pp. 1560-1584.

Lee, Kangseok; Zhan, Xiaoming; Gao, Junjun; Qui, Ji, Feng, Yanan; Meganathan, R.; Cohen, Stanley N. y Georgiou, George (2003) **RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli***. *Cell*, Vol. 114, Tomo 5, pp. 623-634.

Liebl, Wolfgang, Stemplinger, Ilse y Ruile, Peter (1997) **Properties of gene structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium**. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179, No. 3, pp. 941-948.

López Hernández, Mingyar Neftalí (2012) **Estudio de los niveles proteicos de ciclina CYCD2;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays*)**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 5-8.

Malle, Dominggus; Itoh, Takafumi; Hashimoto, Wataru; Murata, Kousaku; Utsumi, Shigeru y Mikami, Bunzo (2006) **Overexpression, Purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168**. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*, Vol. F62, pp. 381-384.

Manisha, M. (2017) **Types of polysaccharides (3 types)**. Biology Discussion [En línea] Disponible en: <http://www.biologydiscussion.com/carbohydrates/polysaccharides/types-of-polysaccharides-3-types/44929> [Fecha de consulta: 11, Diciembre 2017].

Martin. A.; Martínez, F.; Calvo, J.I.; Prádanos, P.; Palacio, L. y Hernández, A. (2002) **Protein adsorption onto an inorganic microfiltration membrane: solute-solid interactions and surface coverage**. *Journal Of Membrane Science*, Vol. 207 pp. 199-202.

Martínez, Tomás F.; Alarcón, Francisco J.; Díaz-López, Manuel y Moyano, Francisco J. (2000) **Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch**. *Electrophoresis*, Vol. 21, pp. 2940-2943.

Matsui, Yoshimitsu; Okada, Sanae; Uchimura, Tai; Kondo, Akihiko y Satho, Eiichi (2007). **Determination and analysis of the starch binding domain of *Streptococcus bovis* 148 raw-starch-hydrolyzing  $\alpha$ -amylase**. *Journal of Applied Glycoscience*, Vol. 54, pp. 217-222.

Matsuura, Yoshiki; Kusunoki, Masami; Harada, Wakako y Kakudo, Masao (1984) **Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A**. *Journal of Biochemistry*, Vol. 95, pp. 697-702.

Mc Tigue, M. Antoinette; Kelly, Catherine T.; Doyle, Evelyn M. y Fogarty, William M. (1995) **The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370**. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 17, pp. 570-573.

Mikami, Bunzo; Iwamoto, Hiroyuki; Malle, Dominggus, Yoon, Hye-Jin; Demirkan-Sarikaya, Elif; Mezaki, Yoshihiro; Katsuya, Yoshio (2006) **Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site**. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 359, Tomo 3, pp. 690-707.

Miller, G. L. (1959) **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Analytical Chemistry*, Vol. 31, No. 3, pp. 426-428.

Morlon-Guyot, Juliette; Mucciolo-Roux, Frédéric; Rodríguez Sanoja, Romina y Guyot, Jean-Pierre (2001) **Characterization of the *L. manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene.** *DNA Sequence*, Vol. 12, No. 1, pp. 27-37.

Muyanja, C.M.B.K.; Narvhus, J.A.; Treimo, J. y Langsrud, T. (2003) **Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage.** *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 80, pp. 201-210.

National Center of Biotechnology Information (2013) **The statistics of sequence similarity scores.** [En línea] Estados Unidos. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial/Altschul-1.html> [Fecha de consulta: 1º Marzo, 2018].

National Center of Biotechnology Information, NCBI (2017) **Protein Tools.** [En línea] Estados Unidos. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/> [Fecha de consulta: 29 Noviembre, 2017].

Nazmi, Ali Reza; Reinisch, Timm y Hinz, Hans-Jürgen (2006) **Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA).** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 453, Tomo 1, pp. 18-25.

Network Protein Sequence Analysis (2017) **PRABI-GERALD Rhone-Alpes Bioinformatic Pole Gerland Site. BLAST search on protein sequence databank.** [En línea] Institute of Biology and Protein Chemistry. Disponible en: [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_blast.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_blast.html) [Fecha de consulta: 29 Noviembre, 2017].

Nielsen, Anders D.; Fuglsang, Claus C. y Westh, Peter (2003) **Effect of calcium ion on the irreversible denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus*  $\alpha$ -amylase: a calorimetric investigation.** *Biochemical Journal*, Vol. 373, pp. 337-343.

Nisha, M. y Satyanarayana, T. (2013a) **Recombinant bacterial amylopullulanases. Developments and perspectives.** *Bioengineered*, Vol. 4, No.6, pp. 388-400.

Nisha, M. y Satyanarayana, T. (2013b) **Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, No. 97, pp. 6279-6292.

Nonaka, T.; Fujihashi, M.; Kita, A.; Hagihara, H.; Ozaki, K.; Ito, S. y Miki, K. (2003) **Crystal structure of calcium free alpha-amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites.** *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 27, pp. 24818-24824.

Nuraida L.; Wachter M.C. y Owens, J.D. (1995) **Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough.** *World Journal of Microbiology and Technology*, Vol. 11, pp. 567-571.

Oikawa, Atsushi (1959) **The role of calcium in Taka-amylase A II. The Exchange reaction of calcium.** *The Journal Of Biochemistry*, Vol. 46, No. 4, pp. 463-473.

Olympia, Minerva; Ono, Hisayo; Shinmyo, Atsuhiko y Takano, Mitsuo (1992) **Lactic acid bacteria in a fermented fishery product, "burong bangus".** *Journal of Fermentation And Bioengineering*, Vol. 73, No. 3, pp. 193-197.

Olympia, Minerva; Fukuda, Hajime; Ono, Hisayo; Kaneko, Yoshinobu y Takano, Mitsuo (1995) **Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “burong isda”, and its amylolytic enzyme.** *Journal of Fermentation And Bioengineering*, Vol. 80, No. 2, pp. 124-130.

Paliwal, Ripusudan L.; Granados, Gonzalo; Lafitte, Honor Renée y Violic, Alejandro D. (2001) **El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) [En línea] Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.htm> [Fecha de consulta: 6, Diciembre 2017].

Paredes López, Octavio; Guevara Lara, Fidel y Bello Pérez, Luis Arturo (2009) **La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz.** *Revista Ciencias*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, No.92, pp. 60-70.

Patrick, Ongol Matrin (2012) **Lactic acid bacteria in health and disease.** *Rwanda Journal of Health Sciences*, Vol. I, Issue 1, pp. 39-50.

Pesarrodona, M.; Unzueta, U. y Vázquez, E. (2015) **“Dialysis: A characterization method of aggregation tendency”** en: *Insoluble Proteins: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Editado por: García-Fruitós, E., Springer Science+Business Media, Nueva York, Estados Unidos, pp. 321-322.

Petrov, Kaloyan; Urshev, Zoltan; Petrova, Penka (2008) **L-(+)-lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis subs. lactis* B84.** *Food Microbiology*. Vol. 25, pp. 550-557.

Petrova, Penka; Milena, Emanuilova y Petrov, Kaloyan (2010) **Amylolytic *Lactobacillus* strains from Bulgarian fermented beverage boza.** *Zeitschrift für Naturforschung* [En línea] Disponible en: <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-409> [16 Mayo 2017].

Petrova, Penka y Petrov, Kaloyan (2012) **Direct starch conversion into L-(+)-lactic acid by a novel amylolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41.** *Starch*. Vol. 64, pp. 10-17.

Petrova, Penka; Petrov, Kaloyan; Stoyancheva, Galina (2013) **Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties and applications.** *Starch*, 65, pp. 34-47.

Peyer, Lorenzo C.; Zannini, Emmanuele y Arendt, Elke K. (2016) Lactic acid bacteria as a sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. ***Trends in Food Science & Technology***, 54, pp. 17-25.

Pohl, Thomas (1990) **“Concentration of proteins and removal of solutes”** en: *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. Editado por Deutscher, Murray P., Volumen 182, Elsevier, Estados Unidos, pp. 68-83.

Prakash, Om; Jaiswal, Nivedita y Pande, Rajesh Kumar (2011) **Effect of metal ions, EDTA and sulfhydryl reagents on soybean amylase activity.** *Asian Journal of Biochemistry*, Vol. 6, No. 3, pp. 282-290.

Raha, Manidipa; Kawagishi, Ikuro; Muller, Volker; Kihara, May y Macnab, Robert M. (1992) ***Escherichia coli* produces a cytoplasmic  $\alpha$ -amylase, AmyA.** *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, No. 20, pp. 6644-6652.

- Rana, Neerja; Walia, Abhishek y Gaur, Ayesha (2013)  **$\alpha$ -Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries.** *National Academic Scientific Letters*. Vol. 36, No. 1, pp. 9-17.
- Ray, B. y Bhunia, A. (2008) **“Microorganisms used in food fermentations” y “Biochemistry of some beneficial traits”** en *Fundamental Food Microbiology*, 4a ed. CRC Press, Estados Unidos, pp.99-106 y 107-112.
- Reddy, Gopal; Altaf, Md.; Naveena B.J.; Venkateshwar, M. y Kumar, E.Vijay (2008) **Amyolytic bacterial lactic acid fermentation – A review.** *Biotechnology Advances*. Vol. 26, pp. 22-34.
- Reed, Michael; Lieb, Anna y Nijhout, H. Frederik (2010) **The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions.** *Bioessays*, Vol. 32, pp. 422-429.
- Reza-Nazmi, Ali; Reinisch, Timm y Hinz, Han-Jürgen (2006) **Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA)** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 453, Tomo 1, pp. 18-25.
- Rezaei, H.; Ashtiani, F.Z. y Fouladitajar, A. (2014) **Fouling behavior and performance of microfiltration membranes for whey treatment in steady and unsteady state conditions.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 31 pp.503-518.
- Rimmel, Martina y Boos, Winfried (1994) **Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology*, Vol. 176, No. 18, pp. 5654-5664.
- Rodríguez Saavedra, Carolina (2011) **Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 6.
- Rodríguez-Sanoja, R.; Morlon-Guyot, J.; Jore, J.; Pintado, J.; Juge, N. y Guyot, J.P. (2000) **Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding.** *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 68, No. 8, pp. 3350-3356.
- Rodríguez-Sanoja, Romina; Oviedo, Norma y Sánchez, Sergio (2005) **Microbial starch-binding domain.** *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 8, pp. 260-267.
- Rodríguez-Sanoja, R.; Ruiz, B.; Guyot J.P. y Sánchez, S. (2005) **Starch-binding domains affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases.** *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 71, No. 1, pp. 297-302.
- Sarian, Fean D.; Janeček, Štefan; Pijning, Tjaard; Ishanawati; Nurachman, Zeily; Radjasa, Ocky K.; Dijkhuizen, Lubbert; Natalia, Dessy; Van Der Maarel, Marc J.E.C. (2017) **A new group of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases with an aberrant catalytic triad.** *Scientific Reports 7. Nature* [En línea] Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep44230.pdf> [Fecha de consulta: 13 de Junio, 2017].
- Satoh, Eiichi; Nimura Youichi; Uchimura, Tai; Kozaki, Michio y Komagata Kazuo (1993) **Molecular cloning and expression of two  $\alpha$ -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*.** *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 11, pp. 3669-3673.

- Satoh, Eiichi; Uchimura Tai; Kudo, Toshiaki y Komagata, Kazuo (1997) **Purification, characterization and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* 148.** *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 12, pp. 4941-4944.
- Schillinger, U. y Holzapfel W.H. (2003) **"Culture media por lactic acid bacteria"** en *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 37, pp. 127-140.
- Schlegel, L.; Grimont, F.; Collins, M.D.; Régnault, B.; Grimont, Patrick A. D. y Bouvet A. (2000) ***Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50, pp. 1425-1434.
- Sefa-Dedeh, Samuel; Cornelius, Beatrice; Sakyi-Dawson, Esther y Ohene Afoakwa, Emmanuel (2004) **Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize.** *Food Chemistry*, No. 86, pp. 317-324.
- Serna-Saldivar, Sergio O.; Rooney, Lloyd W. y Greene, Lawrence W. (1991) **Effect of lime treatment on the availability of calcium in diets of tortillas and beans: rat growth and balance studies.** *Cereal Chemistry*, Vol. 68, No. 6, pp. 565-570.
- Serna-Salvidar, S.O. y Pérez-Carrillo, E. (2016) **"Maize"** en *Encyclopedia Of Food And Health*. Elsevier, pp. 601-609.
- Signas; C., Raucji; G., Jonsson; K., Lindgren; P.E.; Anantharamaiah, G.M.; Hook, M. y Lindberg, M. (1989) **Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides.** *Proceedures of the National Academy of Science USA*. Vol. 86, No. 2, pp. 699-703.
- Singh, Ram S.; Gaganpreet, K. Saini y Kennedy, John F. (2008) **Pullulan. Microbial sources, production and applications.** *Carbohydrate Polymers*, Vol. 73, pp. 515-531.
- Shoseyov, Oded; Shani, Ziv y Levy, Ilan (2006) **Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 70, No. 2, pp. 283-295.
- Southall, Stacey; Simpson, Peter J.; Gilbert, Harry J.; Williamson, Gary y Williamson, Michael P. (1999) **The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch.** *FEBS Letters*, Vol. 447, pp. 58-60.
- Strobl, Stefan; Maskos, Klaus; Betz, Michael; Wiegand, Georg; Huber, Robert; Gomis-Rüth, F. Xavier y Glockshuber, Rudi (1998) **Crystal structure of yellow meal worm  $\alpha$ -amylase at 1.64 Å resolution.** *Journal of Molecular Biology*, Vol. 278, pp. 617-628.
- Sudha (2012) **Effect of different concentrations of metal ions on alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*.** *Research in Biotechnology*, Vol. 3, No. 4, pp. 67-71.
- Sun, H.; Zhao, P.; Ge, X.; Xia, Y.; Hao, Z.; Liu, J. y Peng, M. (2009) **Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, No. 160, pp. 988-1003.

Suri, Devika J. y Tanumihardjo, A. (2016) **Effects of different processing methods on the micronutrient and phytochemical contents of maize: from a to z.** *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. Vol.15, pp. 912-926.

Suud, Duvjir; Takase, Kenji; Fujimoto, Zui; Matsmura, Masatoshi y Mizuno, Hiroshi (2000) **Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*.** *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallization*, Vol. 56, pp. 200-202.

Svensson, Brite y Janeček, Stefan (2014) **Glycoside hydrolase family 13** [En línea] CAZYPedia. Carbohidrate-Active Enzymes. Disponible en: [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_13](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_13) [Fecha de consulta: 6 de Junio, 2017].

Taniguchi, H. y Honnda, Y. (2009) **"Amylases"** en *Applied Microbiology: Industrial*. Elsevier pp.159-163.

Tettelin, Hervé; Nelson, Karen E.; Paulsen, Ian T.; Eisen, Jonathan A.; Read, Timothy D.; Peterson, Scott; Heidelberg, John; DeBoy, Robert T.; Haft, Daniel H.; Dodson, Robert J.; Durkin, A. Scott; Gwinn, Michelle; Kolonay, James F.; Nelson, William C.; Peterson, Jeremy D.; Umayam, Lowell A.; White, Owen; Salzberg, Steven L.; Lewis, Mathew R.; Radune, Diana; Holtzapple, Erick; Khouri, Hoda; Wolf, Alex M.; Utterback, Terry R.; Hansen, Cheryl L.; McDonald, Lisa A.; Feldblyum, Tamara V.; Angiuoli, Samuel, Dickinson, Tanja, Hickey, Erick K.; Holt, Ingeborg E.; Loftus, Brendan J.; Yang, Fan; Smith, Hamilton O.; Venter, J. Craig; Dougherty, Brian A.; Morrison, Donald A.; Hollingshead, Susan K. y Fraser, Claire M. (2001) **Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*.** *Science*, Vol. 293, pp. 498-506.

Todar, Kenneth (2012) **"Lactic acid bacteria"** en *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [En línea] Universidad de Wisconsin, Estados Unidos. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/index.html> [Fecha de consulta: 6, Diciembre 2017].

Turkenburg, Johan P.; Brzozowski, A. Marek; Svendsen, Allan; Borchert, Torben V.; Davies, Gideon J. y Wilson, Keith S. (2009) **Structure of a pululanase from *Bacillus acidopullulyticus*.** *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* [En línea] Wiley Online Library. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.22416/epdf> [Fecha de consulta: 27 Septiembre, 2017].

Turpin, Williams; Humbolt, Christèle y Guyot, Jean-Pierre (2011) **Genetic screening of functional properties of lactic acid bacteria in a fermented Pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 24, pp. 8722-8734.

UniProt (2018) **Proteomes.** [En línea] Disponible en: <http://www.uniprot.org/> [Fecha de consulta: 29 Noviembre, 2017].

van Bueren, A.L.; Finn R.; Ausió, J.; Boraston A.B. (2004) **Alpha-glucan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules found primarily in bacterial pathogens.** *Biochemistry*, Vol. 43.



van Bueren, Alicia Lammerts y Boraston, Alisdair B. (2007) **The structural basis of  $\alpha$ -glucan recognition by a family 41 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima***. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 365, Tomo 3, pp. 555-560.

van Bueren, Alicia Lammerts y Ficko-Blean, Elizabeth (2018) **Carbohydrate-binding modules** in CAZYPedia. Disponible en: [https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding\\_modules](https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules) [Fecha de consulta: 31, Agosto 2018].

Vihinen, M. y Matsala, P. (1989) **Microbial amylolytic enzymes**. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24, pp. 329-418.

Virgilio Virgilio, Tamara (2005) **Purificación de la amilasa de una bacteria del género *Streptococcus* aislada del pozol**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Vishnu, C.; Nveena, B.J.; Altaf, Md.; Venkateshwar M.; Reddy, G. (2006) **Amylopullulanase – A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid**. *Enzyme and Microbial Technology* Vol. 38, pp. 545-550.

Wacher, C.; Cañas, A.; Cook, P.E.; Bárzana, E. y Owens J.D. (1993) **Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 9, pp. 269-274.

Wacher-Rodarte, Carmen (1993) **“Alimentos y bebidas fermentados”** en *Bioteología Alimentaria*. Editado por: García Garibay, Mariano; Quintero Ramírez, Rodolfo y Lopez-Munguía Canales, Agustín. Editorial Limusa, pp. 343-344.

Wasko, Adam; Polak-Berecka, Magdalena y Targonski, Zdzislaw (2010) **A new protein of  $\alpha$ -amylase activity from *Lactococcus lactis***. *Journal of Microbiology and Technology*. Vol. 20, No. 9, pp. 1307-1313.

## ANEXO I

### MEDIO DE CULTIVO DEMAN-ROGOSA-SHARPE-ALMIDÓN (MRS-A)

---

El medio de cultivo DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) fue desarrollado por J.C. DeMan, M. Rogosa y M.E. Sharpe (1960). Su formulación permite el desarrollo adecuado de lactobacilos y bacterias ácido lácticas. La peptona, el extracto de carne y el extracto de levadura fungen como las fuentes de nitrógeno y carbono, así como las vitaminas y minerales que posee. Las sales de sodio, magnesio y manganeso son la fuente de cofactores requeridos por las bacterias ácido lácticas, además de que pueden inhibir el desarrollo de otros microorganismos; mientras que el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio para el crecimiento de bacterias Gram negativas (DeMan *et al.*, 1960; Schillinger y Holzapfel, 2003).

La formulación original del medio MRS considera a la glucosa como principal fuente de carbohidratos y energía; sin embargo, para los intereses de esta investigación se sustituyó la glucosa por almidón como la principal fuente de energía e inducir la producción de amilasas por parte de *Sii-25124*, formulando así el medio MRS-Almidón (MRS-A; Tabla AI.i).

**Tabla AI.i** Composición del medio MRS-A para el crecimiento de *Sii-25124*

Componente	Cantidades (g)	Marca comercial del reactivo
	Para 1 L	
Almidón	20	J.T. Baker
Peptona pancreática de caseína	10	BD, Becton, Dickinson and Company
Extracto de carne	10	Oxoid
Extracto de levadura	10	BD, Becton, Dickinson and Company
Citrato de amonio	2.17	J.T. Baker
Acetato de sodio	5	J.T. Baker
Sulfato de magnesio	0.207	Sigma
Sulfato de manganeso	0.056	Sigma
Fosfato dipotásico	2.62	J.T. Baker

## ANEXO II.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA POR EL MÉTODO DE LA EXTINCIÓN DEL COMPLEJO ALMIDÓN-YODO

---

La porción amilosa del almidón es responsable de la formación de un color morado intenso al contacto con yodo. Las unidades de glucosa en la cadena de amilosa están dispuestas en forma helicoidal de tal manera que seis anillos piranosa forman una vuelta de la hélice. Las dimensiones internas de la espiral son tales que la interacción del yodo con la amilosa produce un complejo de inclusión helicoidal en el que la molécula del halógeno ocupa el centro de la cavidad de la estructura helicoidal (Fogarty, 1983). Se han propuesto diversas modificaciones al método original de Wohlgemuth reportado en 1908. Smith y Roe en 1949 indicaron que bajo condiciones apropiadas de análisis el complejo almidón-yodo puede generar intensidades de color proporcionales al tiempo de incubación y a la concentración de enzima utilizada.

En este trabajo la determinación de actividad amilolítica se realizó con la metodología descrita en la sección VII.i.2, en la cual también se definió la unidad de actividad amilolítica como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Giraud *et al.*, 1993) y misma que se describe en la fórmula AII:

**Fórmula AII.** Definición de la actividad amilolítica

$$\text{Actividad amilolítica} \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{(Abs_{t0} - Abs_{t10})}{m} \times 3$$

En donde:

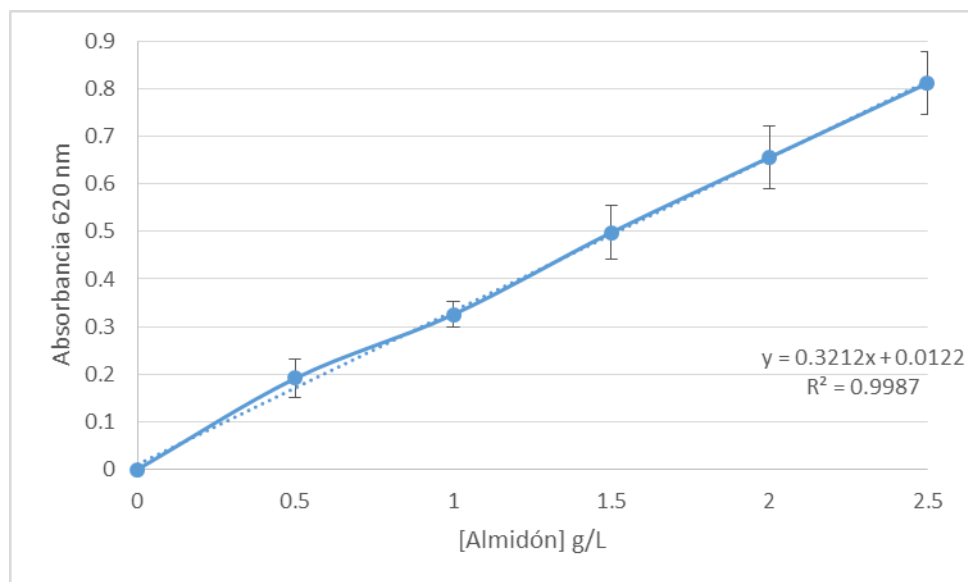
$Abs_{t0}$ , es la absorbancia de la muestra al tiempo cero de reacción,

$Abs_{t10}$ , es la absorbancia de la muestra después de 10 minutos de reacción,

$m$ , es la pendiente de la curva patrón de almidón (Tabla A-II y Gráfico A-II).

**Tabla AII.i** Curva patrón de almidón

[Almidón] g/L	Absorbancia a 620 nm
0	0
0.5	0.19±0.03
1	0.32±0.02
1.5	0.50±0.05
2	0.65±0.06
2.5	0.81±0.06

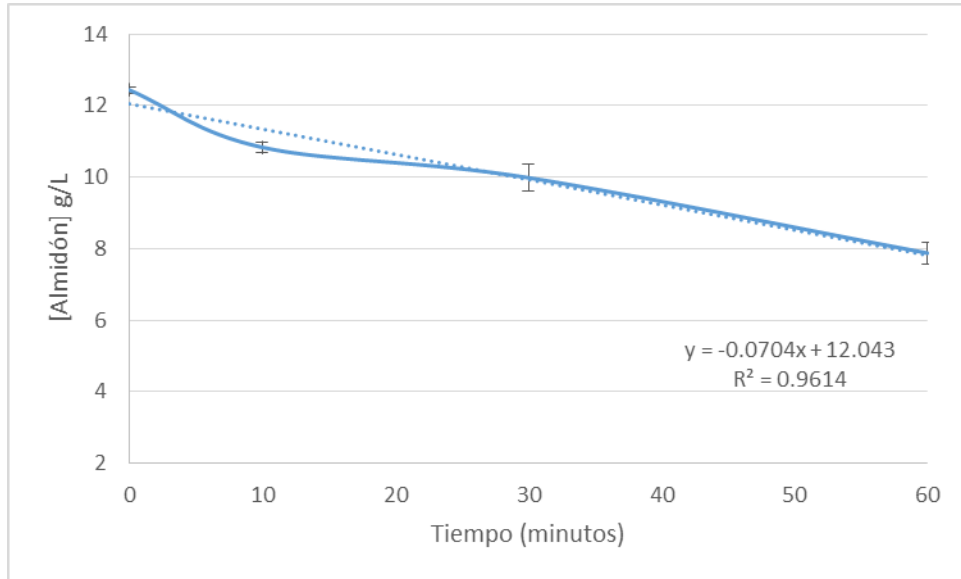


**Gráfico AII.i.** Curva patrón de almidón soluble de papa Panreac. Se muestra la ecuación de la recta, cuya pendiente  $m$  fue de 0.3212. También se muestra el coeficiente de correlación  $R^2$ , con un valor de 0.9987. La curva es el promedio de tres réplicas independientes.

Para confirmar la linealidad de la reacción a 30 minutos, que es el tiempo establecido en la definición empleada de actividad amilolítica (fórmula AII), se realizó una curva de almidón residual durante 30 minutos de reacción, para lo que se utilizó el lisado de *Sii-25124* 10 veces concentrado (sección VII.i.4.3) con una solución de almidón de 12.5 g/L. La reacción se realizó a 37°C, pH 6.8 y con 10 mM de  $MgCl_2$ . La Tabla AII.ii y el Gráfico AII.ii muestran los resultados obtenidos.

**Tabla AII.ii.** Curva de confirmación de la linealidad de la reacción a 30 minutos

Tiempo (minutos)	[Almidón] g/L
0	12.43±0.09
10	10.8±1.15
30	9.98±0.36
60	7.87±0.29



**Gráfico AII.ii** Curva de linealidad de la reacción del lisado celular de *Sii-25124* frente al almidón durante 30 minutos. Se muestra la ecuación de la recta, así como el coeficiente de correlación  $R^2$ , con un valor de 0.9614. La curva es el promedio de tres réplicas independientes.

## ANEXO III.

### PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

---

Con el fin de observar y monitorear las amilasas de *Sii-25124* en las diferentes fracciones obtenidas durante el trabajo experimental (sección VI.i.3), se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes siguiendo el método propuesto por Laemmli (1970). En este anexo se especifican las cantidades de los reactivos utilizados para obtener geles al 8.0% y 7.0% de acrilamida y las condiciones del proceso.

#### AIII.i. Preparación de geles discontinuos

Para una electroforesis en condiciones desnaturalizantes se requiere la preparación de un gel discontinuo, es decir, un gel con dos fases: el gel separador, en el que las proteínas se separarán por tamaño; y el gel concentrador, que se encuentra encima del gel separador y en el que las proteínas se concentrarán en el mismo punto de partida para empezar a migrar juntas y al mismo tiempo a través del gel separador (Laemmli, 1970).

Los geles discontinuos preparados para los ensayos de este trabajo se realizaron a una concentración del 8.0% y 7.0% de acrilamida para el gel separador y de 4.0% para el gel concentrador. En la Tabla A.III.1 se especifican las cantidades usadas de cada reactivo para la preparación de cada uno.

**Tabla. AIII.i.** Preparación de geles al 8.0% y 7.0% de acrilamida

Reactivo	Gel Separador (acrilamida al 8.0%)	Gel separador (acrilamida al 7.0%)	Gel concentrador (acrilamida al 4.0%)
	Volumen para 2 geles	Volumen para 2 geles	Volumen para 2 geles
Acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%	2.66 mL	2.33 mL	0.66 mL
Agua desionizada	4.68 mL	5.01 mL	2.625 mL
Tris-HCl 4x pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	---
Tris-HCl 4x pH 6.8	---	---	1.66 mL
Persulfato de amonio 10%	150 µL	150 µL	50 µL
TEMED*	12 µL	12 µL	5 µL
<b>Total</b>	<b>10 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>5 mL</b>

\*N ,N ,N' ,N'-tetrametiletildiamina (Sigma.Aldrich).

### **AIII.i.1. Preparación de soluciones para geles discontinuos**

#### **AIII.i.1.1. Acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%**

Trabajar con guantes, cubre-bocas y lentes de seguridad. Para una solución de 100 mL se tomaron 30 g de cristales de acrilamida y 0.8 g de cristales de bis-acrilamida. Se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua desionizada, se agitó con una barra magnética hasta completa disolución y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

#### **AIII.i.1.2. Buffer Tris-HCl 4x (1.5 M) pH 8.8 para gel separador**

Para 100 mL de solución se pesaron 18.171 g de tris base (Sigma) y 0.4 g de SDS (dodecil-sulfóxido de sodio de Sigma); se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua desionizada y se agitó con una barra magnética hasta completa disolución. Posteriormente se ajustó el pH a 8.8 con HCl. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

#### **AIII.i.1.3. Buffer Tris-HCl 4x (0.65 M) pH 6.8 para gel concentrador**

Para 100 mL de solución se pesaron 6.06 g de tris base y 0.4 g de SDS. Se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua desionizada y se agitó con una barra magnética hasta disolver completamente. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl y finalmente se aforó a 100 mL. Se almacenó a 4°C.

#### **AIII.i.1.4. Solución de persulfato de amonio 10%**

Para 10 mL de solución se pesó 1 g de persulfato de amonio y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL. Se colocó el volumen necesario de agua desionizada para aforar a 10 mL y se disolvió totalmente con ayuda de un vórtex. Se hicieron alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorff y se utilizó inmediatamente.

### **AIII.ii. Preparación de buffer de carga 4x**

Cada muestra que se pretende correr en una electroforesis debe prepararse con las condiciones adecuadas para que las proteínas puedan migrar de la forma esperada. Por tanto se usa un buffer de carga que contiene agentes desnaturizantes y reductores con el fin de mantener las condiciones del método (Laemmli, 1970), así como un colorante para poder visualizar el frente de corrida. El buffer de carga contiene los siguientes reactivos:

- Buffer Tris-HCl 200 mM pH 6.8
- 0.05% de azul de bromofenol
- 40% de glicerol

- 8% de SDS
- 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol

Para preparar 50 mL de buffer se pesaron 1.2114 g de tris base, se colocaron en un vaso de precipitados y se disolvieron en 35 mL de agua desionizada con agitación constante. En el mismo vaso de disolución se colocaron 0.025 g de cristales de azul de bromofenol, 20 mL de glicerol (J.T. Baker) y 4 g de SDS. La disolución se mantuvo en agitación hasta completa disolución y posteriormente se ajustó el pH a 6.8 con HCl. Se aforó a 50 mL con agua desionizada y se almacenó a temperatura ambiente. Justo antes de usarse para realizar la electroforesis se tomó una alícuota de 1 mL y se colocaron 0.05 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol. La alícuota se almacenó a 4°C por no más de un mes.

Las muestras se prepararon colocando 3 partes de muestra de proteína con 1 parte de buffer de carga 4x. Por tanto, para preparar 40  $\mu$ L de muestra para electroforesis se tomaron 30  $\mu$ L de muestra de proteína y 10  $\mu$ L de buffer de carga 4x. Se agitó vigorosamente y después se incubó a 88°C durante 8 minutos para romper las interacciones débiles en las proteínas y asegurar su desnaturalización. Finalmente se cargaron 20  $\mu$ L de muestra preparada en cada pozo del gel.

### **AIII.iii. Buffer de electrodos 10x**

Para que la migración de proteínas se lleve a cabo a través del gel es necesario proporcionar el medio por el cual la carga eléctrica pueda fluir del ánodo al cátodo en la cámara de electroforesis. Para ello se usa el buffer de electrodos, que contiene iones tris y glicina, así como SDS para mantener las condiciones desnaturalizantes del sistema. Las concentraciones de los reactivos del buffer de electrodos 10 veces concentrado (10x) son:

- Tris base 250 mM
- Glicina 1920 mM
- 1% de SDS

Para preparar 500 mL de buffer se pesaron 72.06 g de glicina y se colocaron lentamente en un vaso de precipitados con 300 mL de agua desionizada en agitación constante. Hasta la completa disolución de la glicina se colocaron 15.1425 g de tris base y finalmente 5 g de SDS. Al disolverse completamente se aforó a 500 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

Para realizar la electroforesis se hizo una dilución 1x del buffer, para lo cual se tomaron 50 mL del buffer 10x y se llevaron a 500 mL de agua desionizada. Esta nueva solución se colocó en la cámara de electroforesis.



## ANEXO IV.

### PREPARACIÓN DE ZIMOGRAMAS CON EL MÉTODO DE EXTINCIÓN DEL COMPLEJO ALMIDÓN-YODO.

---

Con el fin de identificar qué proteínas obtenidas en el gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes tenían actividad amilolítica, se utilizó el método propuesto por Boettcher y de la Lande (1968) en el que un gel sometido a las mismas condiciones desnaturizantes de electroforesis descritas en el Anexo III, se adecuó para una incubación en una solución concentrada de almidón para después teñirla con yodo-yoduro. La solución de yodo-yoduro tiñe de una coloración morada intensa las zonas del gel en donde existe almidón intacto; sin embargo, las zonas en las que el almidón se rompe debido a una desestructuración de la hélice de amilosa no se tiñen: se presentan como zonas blancas que contrastan con un fondo morado intenso revelando posibles bandas de proteína con actividad amilolítica.

Para preparar estos zimogramas se realizaron los pasos descritos a continuación:

#### **AIV.i. Renaturalización de geles**

Debido a que se realizaron electroforesis en condiciones desnaturizantes para separar por tamaño las proteínas de las fracciones obtenidas durante el desarrollo experimental, éstas se desnaturizaron y perdieron actividad. Para recuperarla se hicieron lavados con el fin de eliminar el SDS de los geles y renaturalizar lo más posible a las amilasas presentes en los geles obtenidos tras el proceso de electroforesis. Para ello se realizaron los siguientes lavados:

- Lavado con 15 mL de agua destilada durante 10 minutos a 75 rpm y temperatura ambiente.
- Lavado con 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8 durante 10 minutos a 75 rpm y temperatura ambiente.
- Lavado con 15 mL de agua destilada durante 10 minutos a 75 rpm y temperatura ambiente.
- Lavado con 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8 durante 10 minutos a 75 rpm y temperatura ambiente.

#### **AIV.ii. Incubación con almidón**

Tras el proceso de renaturalización se prepararon 50 mL de una solución de almidón al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8. El buffer del último lavado se desechó y se sustituyó por la solución de almidón. Se incubó durante toda la noche a 37°C.

#### **AIV.iii. Tinción con yodo-yoduro**

Terminado el tiempo de incubación, se desechó la solución de almidón y se hicieron dos lavados con 15 mL de agua destilada durante 10 minutos a 75 rpm y temperatura ambiente.

A partir de una solución stock de yodo-yoduro (0.3% yodo sublimado-3% yoduro de potasio) se prepararon 50 mL de una dilución 1/25 para agregarla al gel impregnado de almidón. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y 75 rpm. Posteriormente se retiró la solución de yodo-yoduro y se destiñó con 15 mL de agua destilada. Se buscó la presencia de zonas no teñidas debido a posibles bandas de proteína con actividad amilolítica.

Los zimogramas se correlacionaron con los geles de proteína teñidos con azul de Coomassie (Imperial Blue Protein Stain de Thermo Scientific) y se documentaron inmediatamente con el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

## ANEXO V

### DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

---

La cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS se fundamenta en la reacción en medio alcalino entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y el grupo carbonilo libre de moléculas de carbohidratos conocidas como azúcares reductores, debido a su facilidad para ser oxidadas. En esta reacción, el carbonilo libre (aldehído) de los azúcares se oxida originando un grupo carboxilo, mientras que el ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduce para formar el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. La presencia de azúcares reductores se evidencia por un cambio de coloración en el medio de reacción de amarillo a rojo, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de azúcares reductores, por lo que pueden ser cuantificados a través de su absorbancia a 540 nm, aplicando la ley de Lambert-Beer (Miller, 1959).

Esta técnica es muy utilizada en el estudio de la fermentación enzimática de almidón y otros polisacáridos, debido a que la  $\alpha$ -hidrólisis enzimática de estos sustratos produce oligosacáridos con su grupo carbonilo libre, lo cuales, dependiendo de su tamaño, pueden reaccionar con el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Conforme la hidrólisis del polisacárido y de los oligosacáridos avanza, la cantidad de azúcares reductores en la mezcla de reacción aumenta, intensificándose la coloración roja generada por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

A continuación se muestran los reactivos utilizados para la preparación del reactivo de DNS, así como la metodología empleada para obtener la curva patrón que se utilizó para cuantificar los azúcares reductores generados por las amilasas de *Sii-25124* durante la hidrólisis de almidón y amilopectina (secciones VII.iii.5.1.2 y VIII.iii.5.1.1).

#### AV.i. Preparación del reactivo de DNS

Los reactivos se colocaron en un vaso de precipitados con agua destilada (150 mL para preparar 250 mL de reactivo) en el orden indicado en la Tabla AV.i, asegurando la completa disolución de un reactivo antes de agregar el siguiente. Una vez completada la disolución de los reactivos, la solución de aforó, se almacenó en un frasco ámbar y se dejó reposar a 4°C durante toda la noche.

**Tabla AV.i.** Preparación para diferentes volúmenes del reactivo de DNS

Reactivos	1 L	500 mL	250 mL
NaOH	14 g	7 g	3.5 g
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	7.5 g	3.75 g	1.875 g
Fenol, cristales	5.4 g	2.7 g	1.35 g
Metabisulfito de sodio	5.9 g	2.95 g	1.475 g
Tartrato de Na-K	100	50 g	25 g

## AV.ii. Preparación de curva patrón

Se preparó una solución stock de glucosa (BD, Becton, Dickinson and Company) de 1 mg/mL. A partir de ésta se prepararon diluciones para obtener concentraciones de glucosa de 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL. Después, se tomaron 0.5 mL de cada dilución, se colocaron en tubos de vidrio y a cada una se le agregaron 0.5 mL de reactivo de DNS. Las muestras se llevaron a un baño maría en ebullición por 10 minutos y en seguida se colocaron en hielo. Finalmente, se agregaron 4 mL de agua destilada y tras reposar 5 minutos se leyó su absorbancia a 540 nm. En la Tabla AV.ii se muestra la curva patrón obtenida, resultado de tres réplicas individuales.

Tabla AV.ii. Curva patrón de glucosa

[Glucosa] (mg/mL)	Absorbancia a 540 nm
0	0
0.2	0.18±0.04
0.4	0.35±0.02
0.6	0.55±0.05
0.8	0.80±0.12
1.0	1.00±0.09

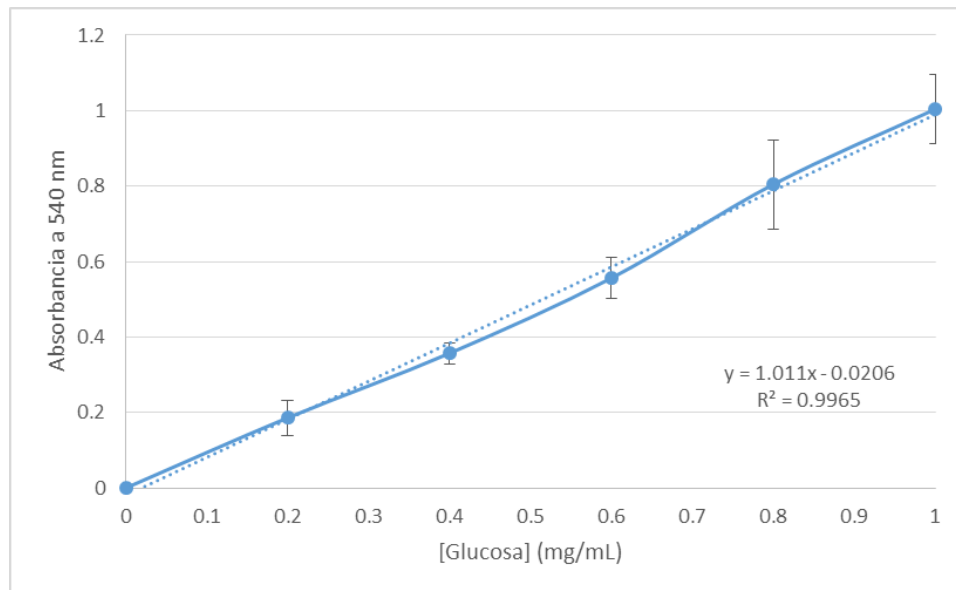


Gráfico AV.i. Curva patrón de glucosa. Se muestra la ecuación de la recta, así como el coeficiente de correlación  $R^2$ . La curva obtenida es resultado de tres réplicas independientes.

## ANEXO VI.

### ALINEAMIENTO ENTRE LA AMILOPULULANASA AMY4 Y LA ALFA-AMILASA AMY3 DE *SII-25124*

De acuerdo con los zimogramas obtenidos durante el desarrollo experimental (figuras VIII.4 y VIII.5 de las secciones VIII.i.2.3 y VIII.ii, respectivamente) se observaron dos bandas de actividad amilolítica: una en zona de alto peso molecular (aproximadamente 250 kDa) y otra en zona de bajo peso molecular (aproximadamente 50 kDa), a las que se les designó arbitrariamente como Amy4 y Amy3, respectivamente. Con el fin de saber si la banda de actividad situada en la zona de bajo peso molecular se trataba o no de un producto de degradación de la amilasa de alto peso molecular, se secuenciaron ambas proteínas, como se explica en la sección VII.ii. Según los resultados expuestos en la misma sección, la banda de alto peso Amy4 se identificó como una amilopululanasa de 246.3 kDa, mientras que la de bajo peso molecular correspondió a una  $\alpha$ -amilasa de 55.7 kDa. El alineamiento realizado con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor mostró 4% de identidad entre ambas enzimas, indicando que se trata de amilasas diferentes. El alineamiento realizado se muestra en la figura AVII.i:

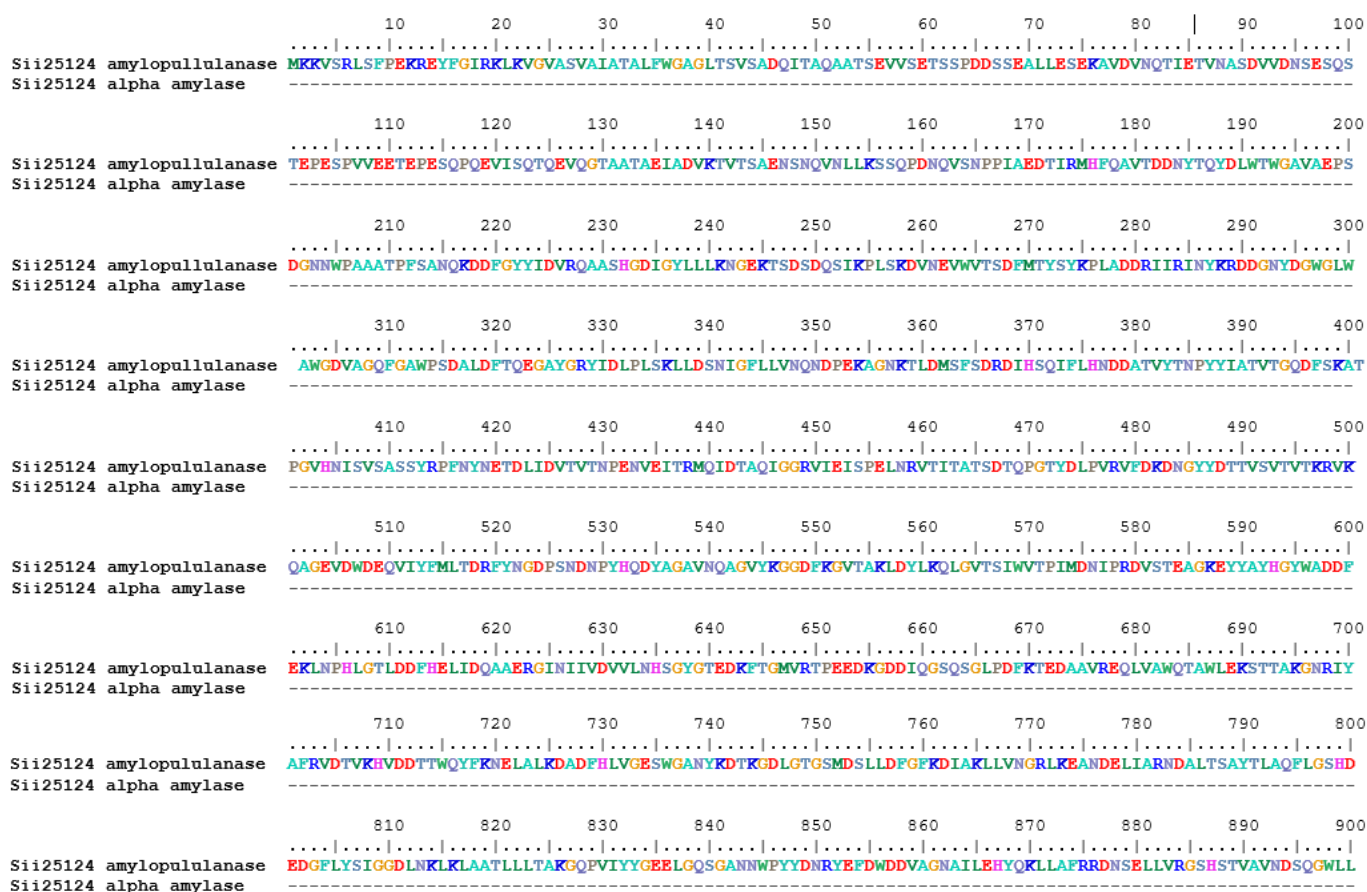




Figura AVII.i. Alineamiento de aminoácidos entre la amilopululanasa (Amy4) y la  $\alpha$ -amilasa (Amy3) de *Sii-25124* realizado con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

**ANEXO VII. TABLAS DE DATOS DE LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE LAS AMILASAS DE *Sii-25124* FRENTE AL PH, LA TEMPERATURA E IONES METÁLICOS**

**Tabla VII.1.** Estabilidad de las amilasas de *Sii-25124* a diferentes temperaturas durante dos diferentes tiempos de incubación.

	Actividad recuperada (U/mL)	% Recuperado	Actividad recuperada (U/mL)	% Recuperado
Control	106.6±15.1	100±12.6		
Temperatura	10 minutos de incubación		60 minutos de incubación	
15° C	71.79±8.52	66.4±10.8	99.8±8.3	93.6±16.3
25° C	98.52±13.03	92.4±11.8	100.4±11.3	94.2±16.1
30° C	122.12±8.52	114.5±7.8	109.5±14.8	102.7±14.3
37° C	130.22±18.03	122.1± 15.5	97.5±17.05	91.5±13.5
45° C	117.29±15.6	110±16.7	38.77±4.2	36.4±15.7
50° C	44.92±10.3	42±13	27.01±4.4	25.3±12
55° C	27.58±6.1	25.8±4.5	23.6±2.1	22.1±7
60° C	27.58±7.2	25.8±9.12	5.26±1.6	4.9±1.3

**Tabla VII.2.** Estabilidad de la actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124* tras la incubación a diferentes pHs

pH	Actividad Recuperada (U/mL)	%Recuperado
Control	106.6±15.1	100±12.6
3.0	0.0	0
4.0	44.35±3.04	41.6±3.23
5.0	54.6±7.6	51.2±8.2
5.5	67±9.4	62.8±15.8
6.0	65.7±5.2	61.6±16.3
6.8	148.8±15.2	139.6±15.8
7.0	142.4±7.6	133.5±10.7
7.5	142.4±3.8	133.5±6.2
8.0	148.11±4.6	140±10.5
9.0	85.3±3.8	80±6.1

**Tabla VII.3** Actividad amilolítica de las amilasas de *Sii-25124* tras incubarlas con diferentes iones metálicos (10 mM)

Ión (10 mM)	Actividad Recuperada (U/mL)	% Recuperado
Control	60.98±7.6	100±14.2
Ba <sup>+</sup>	27.01±6.7	44.3±14.1
Ca <sup>2+</sup>	68.47±5.6	112±15.5
Cu <sup>2+</sup>	50.21±3.04	83.3±5.4
Fe <sup>3+</sup>	70.75±4.56	116±7.5
Hg <sup>2+</sup>	0.0	0.0
K <sup>+</sup>	54.02±8.4	88.6±11.5
Mg <sup>2+</sup>	105.97±7.6	173.8±14.8
Mn <sup>2+</sup>	89.4±3.8	146.6±7.2
Na <sup>+</sup>	68.09±4.7	11.17±1.6
Zn <sup>2+</sup>	50.21±7.6	82.3±18.3