

Purificación parcial de α -amilasa producida por *Bacillus licheniformis* lb04

Anaid M. Silva-Salinas^a, Melissa M. Rodríguez-Delgado^a, Ulrico J. López-Chuken^a, Jesús A. Gómez-Treviño^b, Edgar A. Blanco-Gómez^{a*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología, Apodaca, México, C.P. 66629,

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biología Molecular, Ave. Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México, C.P. 66455.

*edgar.blancogmz@uanl.edu.mx

Palabras clave: SDS-PAGE, α -amilasa, almidón, zimograma, hidrólisis de almidón

Introducción

Las amilasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 dentro de los gránulos que conforman al almidón. Las α -amilasas (EC. 3.2.1.1.3) son las endoamilasas más utilizadas en la degradación del almidón, debido a su habilidad para romper indiscriminadamente los enlaces dentro de las cadenas de amilosa y amilopectinas, liberando maltooligosacáridos y dextrinas¹. Las macromoléculas y proteínas producidas por organismos adaptados a condiciones ambientales inestables suelen mostrar propiedades de termoestabilidad, resistencia a cambios de pH, tolerancia a bajos niveles de nutrientes, entre otras características. Por tales razones las enzimas producidas por estos microorganismos suelen ser óptimas para la adaptación industrial². La ventaja económica que acompañan a estas enzimas va desde el ahorro energético hasta la sustitución por sustratos económicos. La α -amilasa producida por *Bacillus licheniformis* lb04 ha demostrado la capacidad de degradar el almidón bajo condiciones ácidas y de altas temperaturas³. En este estudio se muestra el proceso que se siguió para obtener su purificación parcial.

Metodología

La cepa de *B. licheniformis* lb04 se cultivó en 250 mL del medio Deljou, enriquecido con almidón soluble para la producción de amilasas⁴ a 45 °C/150 rpm por 48 hrs. El sobrenadante fue recolectado y concentrado por centrifugación (12,000g X 40 min/ 4 °C) para análisis de proteínas por método de Bradford⁵. La fracción fue purificada parcialmente por saturación de sulfato de amonio al 85%, seguido por un dializado overnight a través de una membrana de 12 – 14,000 kDa a 4 °C contra un buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.5). El dializado se analizó para la detección de azúcares reductores usando ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm. El concentrado enzimático fue analizado posteriormente a través de un gel SDS-PAGE y un zimograma para la detección de amilasas.

Resultados y discusión

A través de la saturación con sulfato de amonio se pudieron recuperar 3.0 mg de proteína (Tabla 1). La prueba de DNS mostró la presente de azúcares reductores en el sobrenadante con un punto máximo a las 48 hrs (2.35 mg/mL \pm 0.15). La fracción recolectada fue inyectada en un gel SDS-PAGE para la detección del peso molecular de la α -amilasa donde se estimó un peso aproximado de 130 kDa (Fig. 1), así como una zimografía para la confirmación de su capacidad amilolítica.

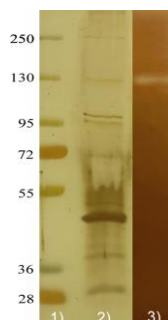


Figura 1. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Análisis de fracción enzimática dializada tras 48 h de cultivo. Carril 3. Zimograma, banda correspondiente a la α -amilasa producida por *B. licheniformis* lb04

El peso molecular para las α -amilasas suele estar entre los 55 y 70 kDa, sin embargo para el caso de las enzimas termoestables han sido reportadas enzimas con pesos mayores, llegando algunas hasta los 210 kDa⁶. La enzima mostró actividad enzimática de 177.7 U mg⁻¹ \pm 5.3 a 65 °C en condiciones pH ácido (2.0).

Tabla 1. Tabla de purificación

Proceso	Actividad Total (U)	Proteínas Totales (mg)	Actividad Específica	Purificación (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto enzimático crudo	14,450	44	328	1.0	100
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ [65 %]	11,740	10	1,142	3.5	81
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ [85 %]	5,231	3	1,868	5.7	36

Conclusiones

La bacteria *B. licheniformis* lb04 es capaz de producir una α -amilasa de alto peso molecular resistente a altas temperaturas, sin embargo la purificación con (NH₄)₂SO₄ no es suficiente para la obtención de la enzima pura. Es necesario acoplar un procedimiento adicional para el aislado efectivo de la enzima.

Agradecimientos

Se agradece al CONACyT, a la UANL-FCQ y al instituto del CIByN por las becas, equipos e instalaciones otorgadas para la realización del presente trabajo.

Referencias

- Derde, L.; Gomand, S.; Courtin, C; Delcour, J.; Food Chem. 2012, 135, 713–721.
- Sundarram, A.; Murthy, T.; J. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 2, 166–175.
- Blando de la cruz, L. Glycerol bioconversion by thermotolerant microorganism isolated from northeast Mexico. Grado de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2016.
- Deljou, A.; Arezi, I.; Period. Biol. 2016, 118,405–416.
- Bradford, M.; Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.
- Maktouf, S.; Kamoun, A.; Moulis, C.; Remaud, M.; Ghribi, D.; Châabouni, S.; J. Microbiol. Biotechnol. 2013, 23, 489-498.