



Nova Scientia

E-ISSN: 2007-0705

nova\_scientia@delasalle.edu.mx

Universidad De La Salle Bajío

México

Montor-Antonio, J. J.; Olvera-Carranza, C.; Reyes-Duarte, D.; Sachman-Ruiz, B.; Ramírez-Coutiño, L.;  
Del Moral, S.

Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos  
cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan

Nova Scientia, vol. 6, núm. 12, mayo-octubre, 2014, pp. 39-59

Universidad De La Salle Bajío

León, Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203330981003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## *Revista Electrónica Nova Scientia*

Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan

Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region

**J. J. Montor-Antonio<sup>1</sup>, C. Olvera-Carranza<sup>2</sup>, D. Reyes-Duarte<sup>3</sup>, B. Sachman-Ruiz<sup>2</sup>, L. Ramírez-Coutiño<sup>1</sup> y S. Del Moral<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Depto. de Procesos y Tecnología, México DF

---

**México**

Sandra del Moral. E-mail: [smoral@unpa.edu.mx](mailto:smoral@unpa.edu.mx), [sandra\\_ibt79@hotmail.com](mailto:sandra_ibt79@hotmail.com)

## Resumen

La amilasa (E.C. 3.2.1.1) de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) fue producida por fermentación sumergida. Se probó el efecto de peptona, extracto de levadura,  $\text{Ca}^{+2}$  y glicina en la producción de AmiJ33. El extracto de levadura y  $\text{Ca}^{+2}$  tuvieron un efecto positivo sobre la síntesis de AmiJ33. La enzima fue recuperada mediante precipitación a saturación al 60% con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El peso molecular aproximado de la enzima purificada fue de 50 kDa. Así mismo, se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, concluyendo que los valores más altos de actividad se observaron a pH 6.0 y 80°C, respectivamente. En condiciones ligeramente ácidas (pH 4.0 y 5.0), AmiJ33 mantuvo el 72% de su actividad. AmiJ33 fue estable por 3 h a 40°C, y por 30 min a 45 y 50°C, conservando el 88 y 82% de actividad residual. A 60°C, la actividad disminuyó 40%. La actividad de AmiJ33 se incrementó 50.27% con  $\beta$ -mercaptoetanol, no fue inhibida por EDTA y se inhibió totalmente con SDS.

**Palabras Clave:** suelos,  $\alpha$ -amilasa, *Bacillus amyloliquefaciens*, producción enzimática

Recepción: 05-09-2013

Aceptación: 29-11-2013

## Abstract

Amylase (EC 3.2.1.1) from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33) was produced by submerged fermentation. Peptone, yeast extract,  $\text{Ca}^{+2}$  and the glycine effect over AmiJ33 production was analyzed shown that yeast extract and  $\text{Ca}^{+2}$  concentration increased in 2.5 times the AmiJ33 production. By mean precipitation using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , the enzyme was recovered and the protein was identified by SDS-PAGE demonstrating that AmiJ33 has a molecular weight of 50 kDa. Temperature and pH optimus were determined, the highest values of activity were observed at pH 6.0 and 80° C, however, using slightly acid conditions (pH 4.0 and 5.0) AmiJ33 kept 72% of activity. AmiJ33 was stable for 3 h at 40°C, and 30 min at 45-50° C, retaining 88 and 82% of residual activity respectively. At 60°C, the enzyme activity decreased 40%. The divalent ions increased slightly AmiJ33 activity, however EDTA did not inhibit its activity, while SDS inhibited it completely.

**Keywords:** soils,  $\alpha$ -amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, enzyme production

## Introducción

Las  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) con retención de la configuración del carbono anomérico, a partir de polímeros de glucosa, como el almidón y glucógeno. Tienen aplicaciones en diversos sectores: textil, papel, panificación, fermentación, producción de energéticos, preparación de ayudantes digestivos y farmacéuticos. Su principal aplicación es la producción de jarabes de glucosa, maltosa, maltotriosa, dextrina y/o fructosa (van der Maarel *et al.*, 2002, 137). Biotecnológicamente, son las enzimas más importantes, sus ventas en el 2010 se estimaron en \$480 millones de dólares, lo que es equivalente al 30% del mercado mundial de enzimas (Quintero *et al.*, 2010, 31).

Las  $\alpha$ -amilasas provenientes de hongos y bacterias son las más utilizadas en el sector industrial por sus múltiples ventajas: fácil disponibilidad, volumen de producción, estabilidad de operación, modificación y optimización del proceso. Las  $\alpha$ -amilasas bacterianas del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, han encontrado una extensa aplicación en diversos procesos industriales debido a sus amplios rangos de operación de temperatura (25-90°C), resistencia a pH extremos (1.0-11.5) y altos niveles de expresión (Pandey *et al.*, 2000, 135; Quintero *et al.*, 2010, 31).

Generalmente, los niveles de expresión enzimática en los microorganismos son bajos, por lo que es necesario incrementarlos para su producción a nivel industrial. El crecimiento del microorganismo y la expresión enzimática están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, principalmente por la fuente de carbono y nitrógeno (Vijayabaskar *et al.*, 2012, 4918; Premila and Dhandayuthapani 2013, 17; Zar *et al.*, 2013, 120). En el caso de las amilasas de *Bacillus sp.* el uso de fuentes de nitrógeno orgánicas como extracto de levadura, peptona y triptona es determinante para aumentar su producción.

Debido a la creciente demanda de amilasas a nivel industrial, es muy importante el descubrimiento de nuevas cepas bacterianas con actividad amilasa con propiedades diferentes o únicas de nichos ambientales poco explorados.

En este trabajo se describe el aislamiento e identificación de bacterias productoras de amilasas a partir de suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Cuenca del Papaloapan, México. Se seleccionó la cepa *B. amyloliquefaciens* JJC33M debido a su no-

patogenicidad y fácil detección visual de la actividad amilasa en placa. Se evaluaron tres fuentes de nitrógeno y la inclusión de  $\text{Ca}^{+2}$  en la producción enzimática. Se caracterizó bioquímicamente la amilasa seleccionada, evaluando el efecto del pH, la temperatura, sales metálicas sobre la actividad enzimática y la termoestabilidad de 40-60°C.

## **Método**

### **Aislamiento y selección de bacterias.**

Las muestras de suelo se colectaron de cultivos de caña en la región del Papaloapan en el estado de Oaxaca (18° 7' Norte, 96° 17'.577 Oeste, altitud 50 m). Las muestras (500 g) se tomaron a una profundidad de 0-15 cm, se colocaron en bolsas de nylon y se almacenaron a 4°C. Tras su homogenización, se tomó 1 g de muestra y se resuspendió en 1 L de peptona 1% (P/V). Posteriormente, se realizaron diluciones seriales hasta  $10^{-6}$ , inoculando 100 µl de cada dilución sobre cajas Petri con agar nutritivo, las cuales se incubaron a 37°C por 48 h. Después, las cepas fueron resembradas en agar nutritivo con almidón 1% (P/V) incubándose a 37°C por 48 h, a continuación las cajas se inundaron con lugol. Las cepas con actividad amilasa mostraron halos transparentes alrededor de la colonia, éstas se resembraron por punción en agar nutritivo y almidón 1% (P/V) por triplicado para medir la relación diámetro del halo/diámetro de colonia (DH/DC) (Vaseekaran *et al.*, 2010, 1). Las cepas con mayor cociente de DH/DC fueron seleccionadas para experimentos posteriores.

### **Caracterización molecular de las cepas aisladas**

Los aislados se caracterizaron molecularmente mediante el análisis del gen 16s DNA. El ADN genómico se extrajo de 1.5 ml de cultivo incubado por 16 h a 37°C utilizando el kit DNA microbial isolation (MOBIO). El gen 16S DNA fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos fD1 y rD1 bajo las condiciones establecidas por Weisburg *et al.* (1991, 697). Los amplicones fueron purificados y secuenciados por MacroGen, Inc. El análisis filogenético se obtuvo por máxima verosimilitud, bajo un modelo de sustitución de tres parámetros Tamura Nei y con 1500 réplicas de Bootstrap, con el software MEGA V.5.

### **Selección de la fuente de nitrógeno**

La selección de la fuente de nitrógeno se realizó en cajas Petri en medio sólido usando el medio basal (MB) (g/L): 5.0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 citrato de sodio, 6.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.01 MnSO<sub>4</sub>, 0.01 FeSO<sub>4</sub>, 0.001 ZnSO<sub>4</sub> y 10 de almidón, cambiando o adicionando (g/L): 5 extracto de levadura, 10 peptona, 1.0 glicina y 0.1 CaCl<sub>2</sub>. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La fuente de nitrógeno se seleccionó mediante la relación DH/DC del aislado *Bacillus sp.* JJC33M. Las cajas se incubaron a 37°C, 24 h y la actividad amilasa se reveló con lugol.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un diseño unifactorial de las combinaciones de las fuentes de nitrógeno y Ca<sup>2+</sup> mediante MINITAB V14 realizando un ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) de las medias de la relación DH/DC y seleccionando la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para identificar la media significativamente más alta. Se empleó la misma prueba estadística para evaluar el efecto de los iones sobre la actividad de AmiJ33.

### **Producción enzimática**

*Bacillus sp.* JJC33M, se cultivó en medio líquido compuesto por (g/L): 10 almidón, 5.0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 citrato de sodio, 6.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.01 MnSO<sub>4</sub>, 0.01 FeSO<sub>4</sub>, 0.001 ZnSO<sub>4</sub>, 5 extracto de levadura y 0.1 CaCl<sub>2</sub>, a 37°C, 180 rpm por 24h. Las células se centrifugaron a 5000g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se precipitó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60%, se concentró 100 veces con ultrafiltros de 10 kDa. El extracto enzimático crudo (ExC) se utilizó para posteriores mediciones enzimáticas.

### **Determinación de la actividad enzimática**

La velocidad inicial de reacción se midió a 37°C en amortiguador de fosfatos (AP) 50 mM, pH 7.0, almidón 1% (P/V), cuantificando los azúcares reductores liberados mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm (Miller 1959, 426). Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce un micromol de glucosa por minuto.

### **Electroforesis de proteínas**

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE 10% en condiciones desnaturizantes (Laemmli 1970, 680). El gel fue teñido con azul de Coomassie.

### **Efecto de pH, temperatura, termoestabilidad, agentes iónicos y desnaturizantes en la actividad amilasa.**

El efecto del pH sobre la actividad amilasa se midió incubando 1 U/mL del ExC con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y almidón 10 g/L en AP 50 mM (pH de 4-6) y en amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH de 7-8), a 37°C por 15 min. El efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa se determinó a pH 6 en AP 50 mM incubando 1 U/mL del ExC con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y almidón 10 g/L en el intervalo de 40-100°C. La actividad amilasa fue determinada por la técnica del DNS. La termoestabilidad de la enzima se determinó a 40, 45, 50 y 60°C, midiendo su actividad residual a 37°C, con  $\text{CaCl}_2$  1 mM, almidón 10 g/L en AP 50 mM pH 6. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

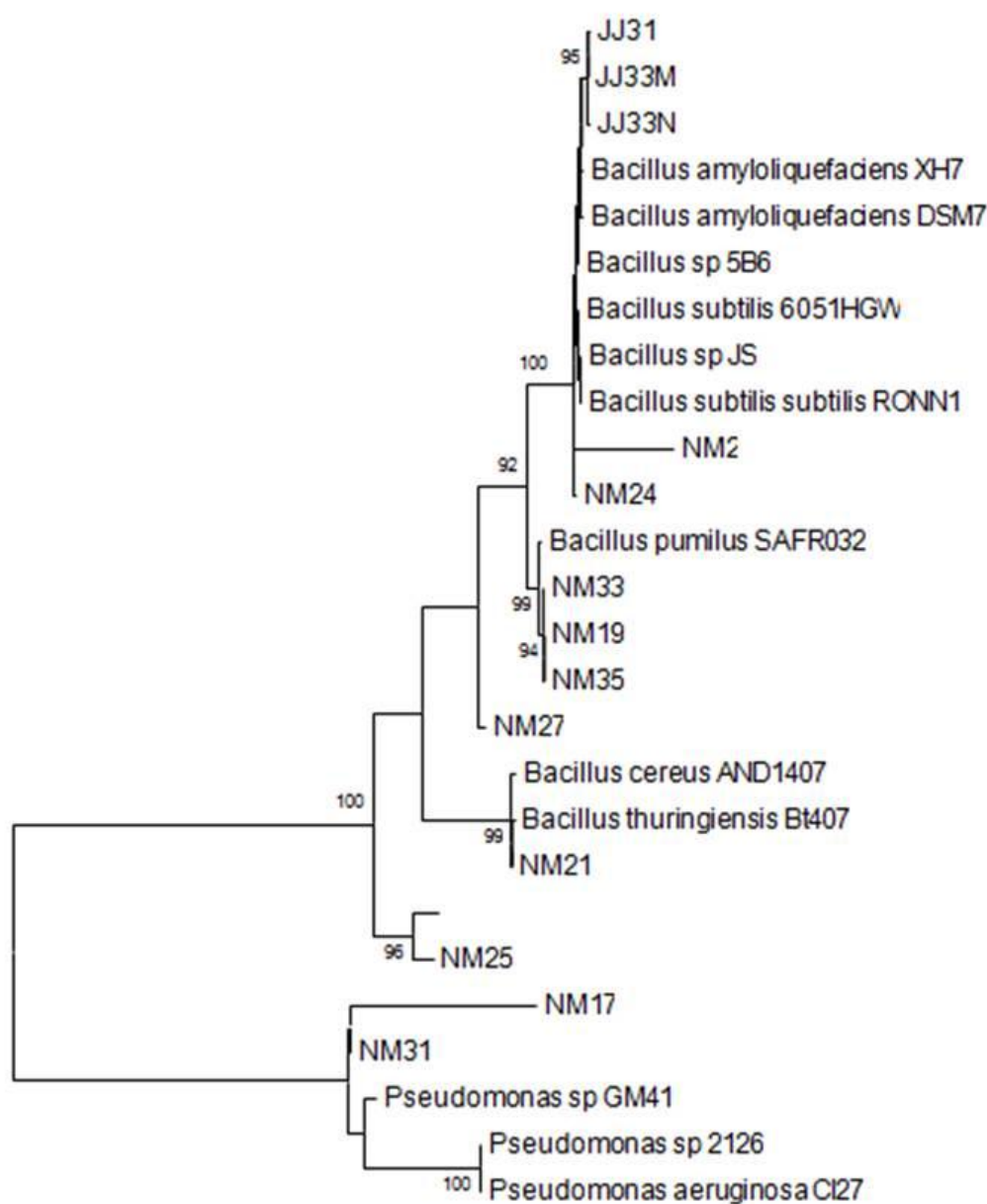
La influencia de agentes iónicos (1 mM) sobre la actividad amilasa se investigó usando  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  y NaCl. Se evaluó el efecto de SDS (10% v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (10% v/v) y EDTA (1, 5 y 10 mM) preincubando la enzima a 37°C por 1 h, posteriormente se adicionó almidón 10 g/L para determinar la actividad residual por medio de la técnica del DNS a 37°C. El control fue cuantificado en ausencia de iones y de agentes quelantes. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## **Resultados y discusión**

### **Aislamiento e identificación de los aislados bacterianos**

Se obtuvieron 12 aislados con actividad amilolítica que se analizaron filogenéticamente mediante el gen 16S DNA. Se identificaron cepas principalmente del género *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Pseudomonas* (fig. 1). NM2 y NM24 comparten un 97% de cobertura y 93% de identidad con *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*; mientras que JJ31, JJ33M y JJ33N presentan 100% de cobertura y 99% de identidad con esas mismas especies. Los aislados NM33, NM19 y NM35 presentan 99% de cobertura e identidad con *B. pumillus*. El aislado NM21 presenta 100% de identidad con *B. cereus*. Por otro lado, NM25 tiene 99% de identidad con *Lysinibacillus sphaericus*. NM31 presentó 99% de identidad con *Pseudomonas sp.* mientras que NM17 solo presentó 91% de identidad con esta misma especie, lo cual sugiere que podría representar una

especie o género nuevo, sin embargo es necesario realizar estudios moleculares complementarios como el análisis del marcador 23S para una adecuada clasificación (Xu and Coté, 2003). La cepa JJC33M fue seleccionada para la producción de amilasa ya que presentó la mayor relación DH/DC en medio sólido (datos no mostrados) además de ser GRAS. Diversos autores han demostrado que existe una relación lineal entre el tamaño del halo de degradación en medio sólido y la actividad enzimática (Alves *et al.*, 2002, 325; Vaseekaran *et al.*, 2010, 1, Juwon *et al.*, 2012, 57), por lo que se utilizó este procedimiento para seleccionar la cepa.



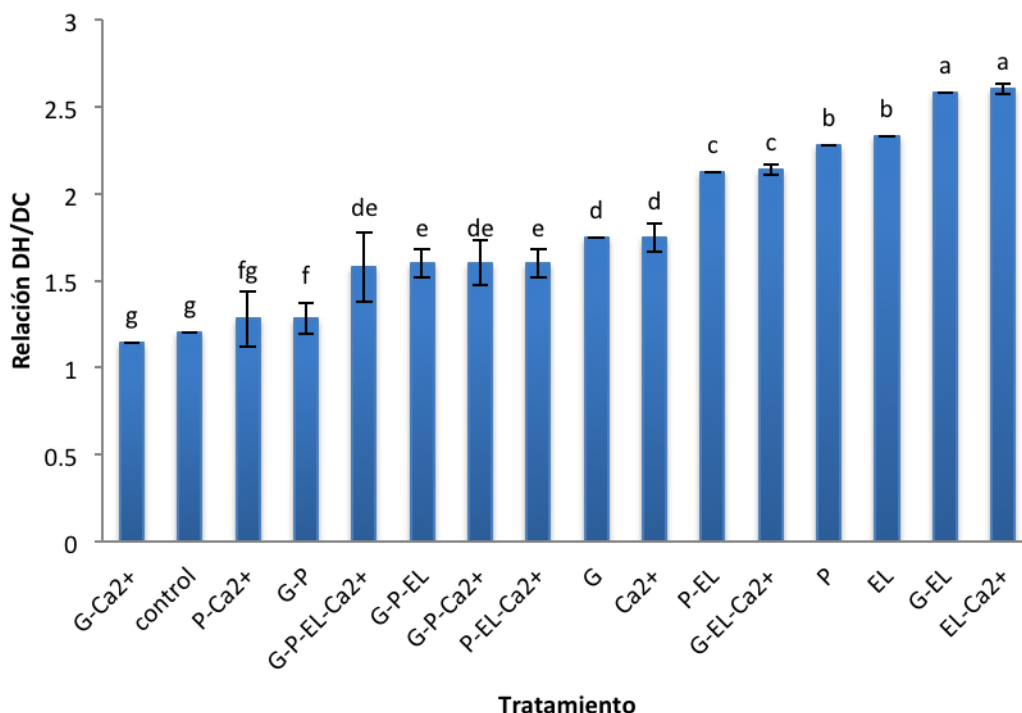
**Figura 1.** Árbol filogenético de las bacterias aisladas con actividad amilasa de suelos cultivados con caña de azúcar.

## Caracterización de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

*B. amyloliquefaciens* JJC33M es un bacilo, Gram positivo, catalasa positiva e indol negativo, fermenta glucosa, sacarosa y manitol. Produce y excreta otras enzimas como  $\beta$ -glucosidasas y proteasas.

## Selección del medio de cultivo para la producción de la amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

La producción de amilasas en el género *Bacillus* está relacionada con la complejidad, naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, regulándola de manera positiva o negativa (Premila and Dhandayuthapani 2013, 17; Thippeswamy *et al.*, 2006, 295). Las fuentes de nitrógeno complejas más estudiadas para la producción de  $\alpha$ -amilasas en especies de *Bacillus* son extracto de levadura (EL) y peptona (P), aunque la utilización de aminoácidos y  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio de cultivo puede incrementar la producción (Zhang *et al.*, 1983, 293). En este estudio se probaron quince medios de cultivo en caja, donde se combinaron EL, P,  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y G (fig. 2). El ANOVA mostró que la combinación de las fuentes de nitrógeno y  $\text{Ca}^{+2}$  tienen un efecto significativo sobre la relación DH/DC, lo cual fue determinado por el valor de  $P < 0.05$ . Mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) se determinó que las combinaciones de EL- $\text{Ca}^{+2}$  y EL-G fueron los mejores tratamientos, aumentando la DH/DC 2.25 veces con respecto al control. La P sola tuvo el mismo efecto que el EL, siendo el segundo mejor tratamiento, sin embargo cuando la P se combinó con  $\text{Ca}^{+2}$  y G tuvo un efecto incipiente sobre la producción de amilasas ( $\alpha=0.05$ ) (fig. 2). Del mismo modo, la combinación G- $\text{Ca}^{+2}$  no favoreció la producción de amilasas, mostrando casi el mismo nivel de producción que el control. En los casos donde se combinaron G-P-EL, G-P- $\text{Ca}^{+2}$ , el exceso de nutrientes favoreció la producción de biomasa, en detrimento de la producción de amilasa. Resumiendo, el EL en combinación con  $\text{Ca}^{+2}$  y G fue la mejor fuente de nitrógeno para la producción de amilasa, por su alto contenido de minerales, vitaminas, coenzimas y componentes nitrogenados (Vijayabaskar *et al.*, 2012, 4918).

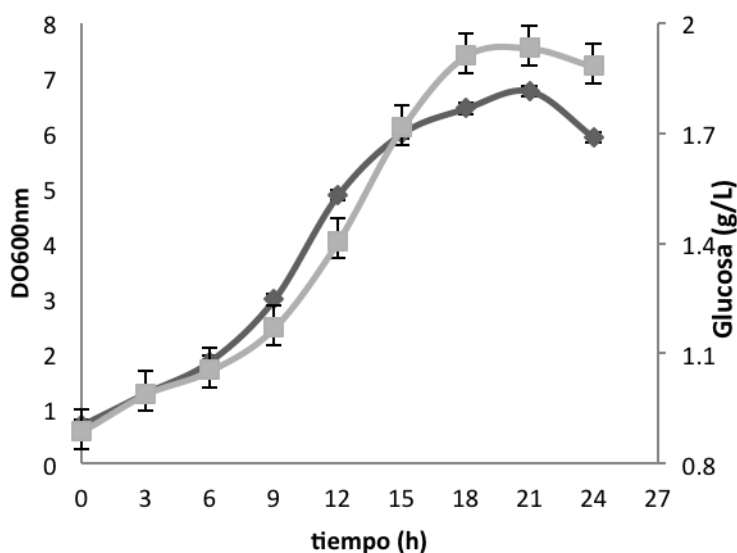


**Figura 2.** Evaluación de EL, P, G y Ca<sup>2+</sup> en la producción de la amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. En los datos sin desviación estándar, el valor de ésta fue cero. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $S=0.1077$ ;  $R^2=96.42\%$ ;  $R^2(\text{Adj})=94.74\%$ ,  $P=0.000$ . Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencia significativa

Estos resultados coinciden con la bibliografía. En el caso de *Bacillus stearothersophilus* KDP la mejor fuente de nitrógeno fue EL 1% (Premila and Dhandayuthapani 2013, 17). *B. amyloliquefaciens* IIB-14 mostró la máxima producción de amilasa con EL 1% en conjunto con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1% (Zar *et al.*, 2013, 120). Sin embargo, para *B. licheniformis* ATCC 12759 la actividad se vio favorecida en presencia de caseína y sales orgánicas, observando solo el 50% de actividad máxima con EL (Akcan 2011, 6833). *Bacillus sp* aumentó su actividad amilasa cuando se combinó  $\text{Ca}^{+2}$  (10 mM), P (1%) y EL (0.5%) (Teodoro and Martins 2000, 298). Thippeswamy *et al.*, (2006, 295) observaron que *Bacillus sp.* solo produjo amilasa en presencia de fuentes de nitrógeno complejas, produciendo la máxima actividad con P, seguida de EL, triptona y extracto de carne. El uso de aminoácidos ha tenido efecto en la producción de amilasa, en el caso de *B. licheniformis* ATCC 12759 la utilización de L-cisteína incrementó la producción en 36%, sin embargo la G la decrementó en 25% (Akcan 2011, 6833), es decir su incorporación regula la síntesis y excreción de la enzima (Gupta *et al.*, 2003, 1599). En este estudio la G no tuvo un efecto importante en la producción de la enzima, solo en sinergia con EL.

### Producción de la amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

La amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M fue producida en medio líquido MB con almidón 10 g/L, EL 5 g/L y  $\text{Ca}^{+2}$  (10 mM) a 180 rpm, 37°C, ya que ésta última se ha reportado como la temperatura de producción óptima de amilasas en diversas cepas de *Bacillus* (Gangadharan *et al.*, 2006, 269; Aygan *et al.*, 2008, 547; Devi *et al.*, 2010, 2534). Durante el cultivo de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se observó un aumento en la producción de azúcares reductores en correlación con el crecimiento, ratificando su cuantificación como método de determinación de actividad amilasa. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria se obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores (18 h), indicando la etapa de mayor producción enzimática (fig. 3). Se ha reportado que durante la fase estacionaria se obtiene la mayor producción de amilasas en diversas cepas de *Bacillus* (Roychoudhary *et al.*, 1989, 197; Malhotra *et al.*, 2000, 378; Gangadharan *et al.*, 2006, 269; Ray *et al.*, 2008, 234; Aygan *et al.*, 2008, 547; Vaseekaran *et al.*, 2010, 1).

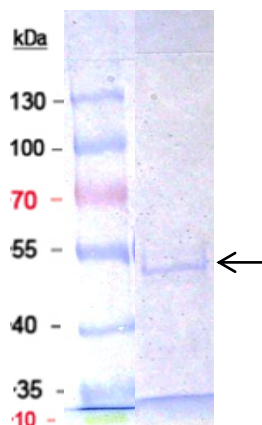


**Figura 3.** Curva de crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M y producción de azúcares reductores. (●) biomasa, (■) azúcares reductores.

### Purificación y determinación del peso molecular de la amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

La amilasa fue purificada a partir del ExC de *B. amyloliquefaciens* JJC33M mediante precipitación con sulfato de amonio. La fracción del 60% presentó actividad amilasa. Diversos autores han reportado la recuperación de amilasas de *Bacillus* sp. saturando con sulfato de

amonio al 40% (Quintero *et al.*, 2010, 31; Bano *et al.*, 2011, 255), 50 y 80% (Shaw *et al.*, 1995, 195), 70 y 80% (Aygan *et al.*, 2008, 547; Gangadharan *et al.*, 2009, 653).

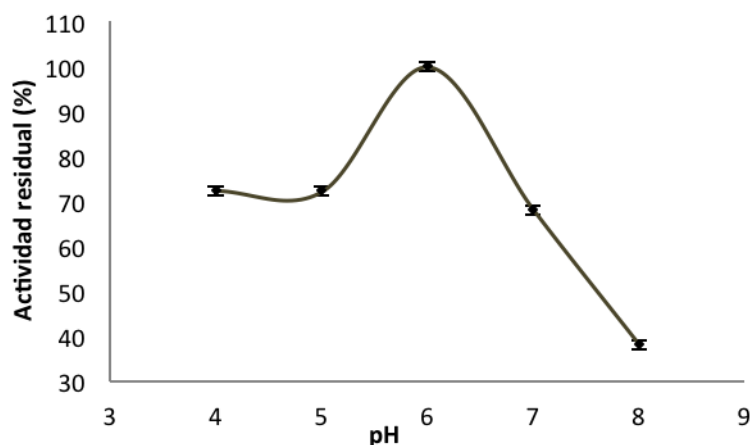


**Figura 4.** Gel SDS-PAGE 10%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: AmiJ33 (F60%) de *B. amyloliquefaciens* JJC33 precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60%.

La fracción ultrafiltrada, nombrada como AmiJ33, se analizó por medio de SDS-PAGE, estimando el peso molecular en 50 kDa (fig. 4). Los pesos moleculares reportados para amilasas producidas por *Bacillus* varían, 56 kDa para *B. subtilis* HAS (Bano *et al.*, 2011, 255), 58 kDa para *B. amyloliquefaciens* (Gangadharan *et al.*, 2009, 653) y 66 kDa para *Bacillus sp.* (Aygan *et al.*, 2008, 547) cuando las muestras migran en condiciones desnaturalizantes.

### Efecto del pH sobre la actividad amilasa.

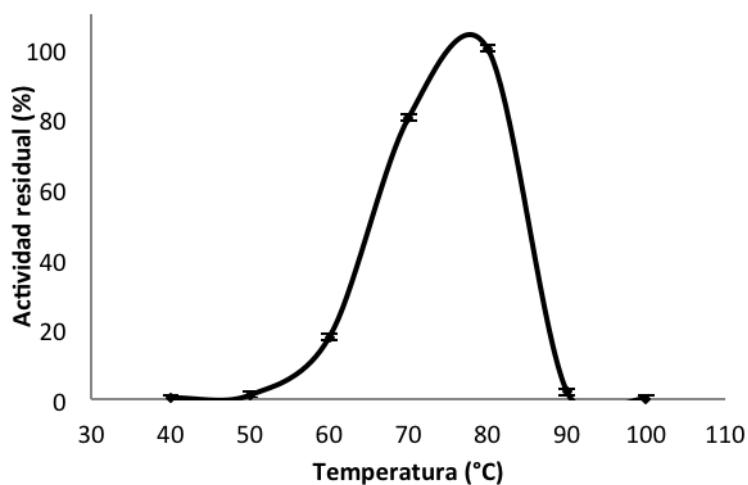
La actividad de AmiJ33 se evaluó en un intervalo de pH de 4.0-8.0. La mayor actividad se registró a pH 6.0 (fig. 5). Entre pH 4.0 y 5.0 la enzima mostró el 72% de la actividad, mientras que a pH 7.0 y 8.0, mantuvo el 68 y 38% de la actividad respectivamente. La mayoría de las amilasas que se conocen presentan mayor actividad a valores de pH neutro o ligeramente ácidos, también se sabe que la actividad disminuye rápidamente a pH alcalino (Bessler *et al.*, 2003, 2141; Goyal *et al.*, 2005, 723; Teodoro and Martins 2000, 298; Gupta *et al.*, 2003, 1599). Sin embargo, AmiJ33 presenta una ventaja sobre las amilasas conocidas, ya que a pH 4.0 mantiene el 72% de la actividad, por lo que podría emplearse en procesos industriales bajo estas condiciones.



**Figura 5.** Efecto del pH sobre la actividad de AmiJ33

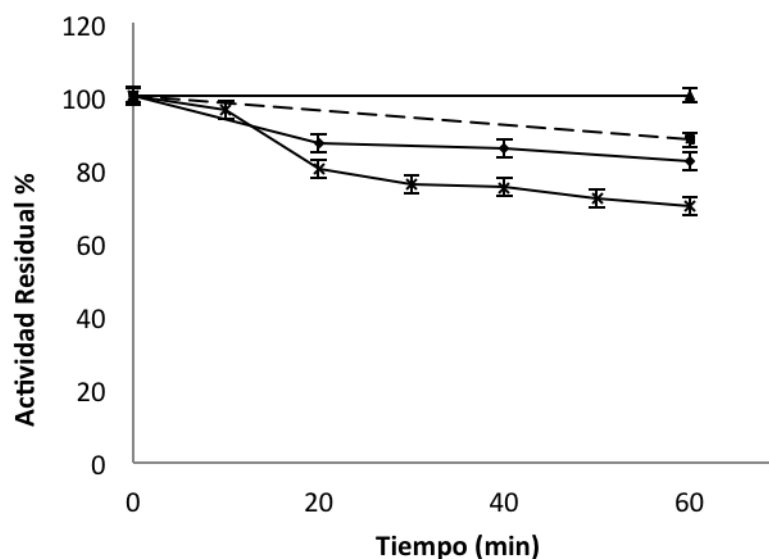
### Efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33 se evaluó de 40-100°C (fig. 6). Se observó un aumento de la actividad desde los 50°C hasta los 80°C, alcanzándose la máxima actividad a 80°C (13.056 U/ml). Posteriormente, la actividad disminuyó drásticamente con el aumento de la temperatura, indicando que entre los 90 y 100°C AmiJ33 ya no es activa. A 70°C AmiJ33 presentó el 76% de la actividad. La mayoría de las amilasas producidas por especies de *Bacillus* muestran su temperatura óptima entre 50-80°C (Vihinen and Mantsala 1989, 329; Wind *et al.*, 1994, 155; Rasooli *et al.*, 2008, 591), las amilasas con temperatura óptima a 90°C pertenecen a *B. licheniformis* (Krishnan and Chandra 1983, 430).



**Figura 6.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33.

El efecto de la temperatura en la estabilidad se examinó entre 40-70°C. AmiJ33 mantuvo el 100% de su actividad a 40°C después de 3 h de incubación, cuando se incubó a 45 y 50°C por 1 h, la actividad residual disminuyó ligeramente, mostrando 88 y 82% de las actividades iniciales, respectivamente (fig. 7). Al incubarse a 60°C durante 1 h, la actividad residual fue de 60%. Como muchas amilasas, AmiJ33 presenta una temperatura óptima alta (80°C), sin embargo no es estable a temperaturas elevadas, como la amilasa de *Bacillus sp.* I-3 que tiene una temperatura óptima de 70°C, pero incubada por 30 min solo mantiene el 30% de actividad inicial (Goyal *et al.*, 2005, 723). En el mismo sentido, la  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis* AX20 mostró estabilidad a 50°C por 45 min (Najafi *et al.*, 2005, 349). Asimismo, la amilasa de *B. amyloliquefaciens* fue menos estable que AmiJ33, ya que después de haberse incubado 30 min a diferentes temperaturas 40, 50, 60, 70 y 80°C mostró 85, 62, 55 y 20% de actividad residual, respectivamente (Gangadharan *et al.*, 2009, 653).

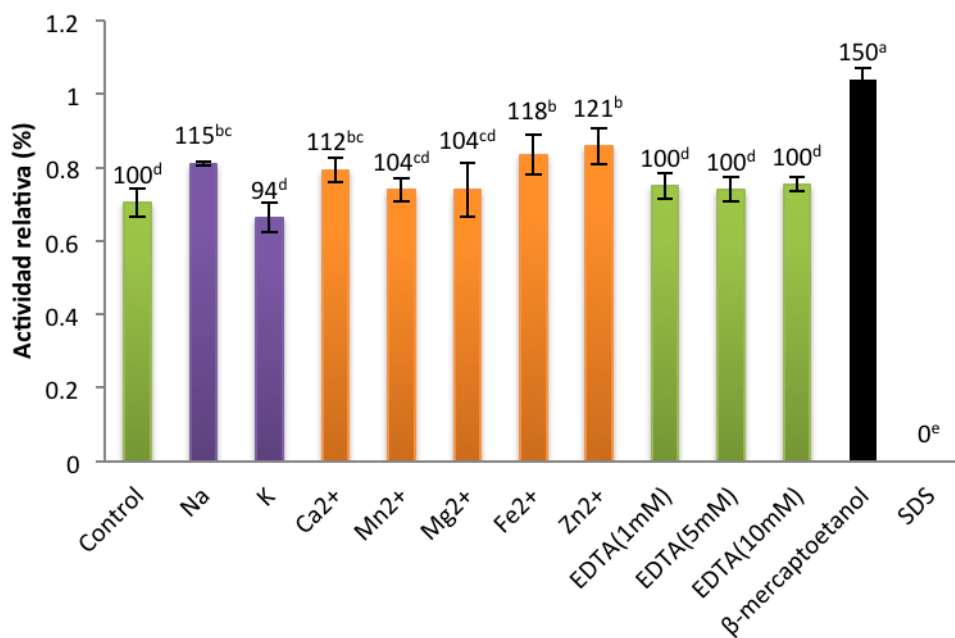


**Figura 7.** Estabilidad térmica de AmiJ33. ▲40°C, ● 45°C, ◆50°C, × 60°C.

### Efecto de diferentes agentes iónicos, quelantes y surfactantes sobre la actividad amilasa

En algunos casos, la actividad amilasa es afectada por iones metálicos. Se evaluaron iones monovalentes, divalentes y compuestos más complejos con actividad reductora o quelante (fig. 8). Los resultados se evaluaron mediante una prueba de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). La inclusión

de  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% en el medio de reacción incrementó la actividad enzimática de AmiJ33 en 50.27%, mostrando estadísticamente la media más alta (fig. 8). Se ha observado, de manera limitada, el efecto positivo sobre la actividad de agentes reductores como el DTT y el  $\beta$ -mercaptoetanol en otras amilasas (Ballschmiter *et al.*, 2006, 2206; Aygan *et al.*, 2008, 547). Si AmiJ33 contiene puentes disulfuro, es posible que éstos no sean determinantes para la actividad y por lo tanto su reducción podría conferirle mayor flexibilidad y con ello aumentar la interacción con el sustrato (Carugo *et al.*, 2003, 637). Por otro lado, el SDS al mismo porcentaje inhibió por completo la actividad. Los resultados anteriores parecen indicar que esta enzima no posee puentes disulfuro intra o intermoleculares, que se vean afectados y desestabilicen la estructura de la enzima por este compuesto. Soportando esto, se tiene el estudio de Alikhajeh *et al* (2010, 121), donde en la estructura cristalina de la amilasa BAA de *B. amyloliquefaciens*, interacciona el residuo Asn222 de la cadena A con el grupo carbonilo de la cadena B vía puentes de hidrógeno. Los resultados obtenidos suponen la factibilidad de aplicación de AmiJ33 en un medio con  $\beta$ -mercaptoetanol, por ejemplo en procesos de óxido-reducción. Por lo que respecta al EDTA, éste no tuvo efecto significativo sobre la actividad ( $\alpha=0.05$ ), incluso a concentraciones elevadas (10 mM) y largos periodos de incubación (hasta 24 h), lo que indicaría que AmiJ33 no es una metaloenzima.



**Figura 8.** Influencia de agentes iónicos, quelantes y desnaturalizantes sobre la actividad de AmiJ33. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencia significativa.

Por otra parte, de los iones monovalentes empleados, sólo el  $\text{Na}^+$  tuvo un efecto benéfico al incrementar la actividad de AmiJ33 en un 15%. Los iones divalentes  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  incrementaron la actividad de la enzima, obteniéndose el mayor aumento porcentual de la actividad (21.72%) al incorporar  $\text{Zn}^{+2}$  en el medio de reacción. Es posible, que la presencia de iones  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$  tengan un papel de estabilización estructural, aunque no de manera crucial.

Posiblemente la baja estabilidad térmica de AmiJ33 se deba a la carencia de  $\text{Ca}^{+2}$  estructural, se ha observado que aquellas amilasas que presentan cuatro iones  $\text{Ca}^{+2}$  por cada subunidad, ubicados dos de ellos al sitio activo, son termoestables, incluso a temperaturas mayores a 70°C (Alikhajeh *et al.*, 2010, 121).

## Conclusiones

AmiJ33 a diferencia de las amilasas producidas por otras cepas de *B. amyloliquefaciens*, no es una metaloenzima, lo que le da una ventaja en la producción de jarabes fructosados previa sacarificación del almidón. Asimismo AmiJ33 podría aplicarse en el sector de panificación, ya que es estable a 40°C y se inactiva a temperaturas altas. También su estabilidad frente al  $\beta$ -mercaptoetanol y su pH de actividad posibilita su aplicación en reacciones de óxido-reducción.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por PROMEP 2009-02 103.5/11/6149 y CONACyT 154683. A Brenda Valderrama Blanco por el financiamiento inicial.

## Referencias

Akcan, Nurullah. (2011). High level production of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. Romanian Biotechnological Letters 16:6833-6840.

Alikhajeh, Jahan, Khosro Khajeh, Ranjbar Bijan, Naderi-Manesh Hossein, Yi-Hung Lin, Enhung Liu, Hong-Hsiang Guan, Yin-Cheng Hsieh, Phimonphan Chuankhayan, Yen-Chieh Huang, Jeyakanthan Jeyaraman, Ming-Yih Liua, y Chun-Jung Chena. (2010). Structure of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase at high resolution: implications for thermal stability. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications. F66, 121–129

Alves, Maria Helena, Campos-Takaki, Galba M., Figueiredo-Porto, Ana Lúcia y Milanez, Ivo Milanez. (2002). Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. Brazilian Journal of Microbiology 33:325-330.

Aygan, Ashabil, Arikan 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 39: 547-553.

Ballschmiter, Meike, Futterer, Ole, Wolfgang Liebl (2006) Identification and characterization of a novel intracellular alkaline-amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Applied and Environmental Microbiology 72: 2206–2211

Bano, Saeeda, Qader, Shah, Ali Ul, Aman Afsheen, Syed, Muhammad Noman y Azhar, Abid. (2011). Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. AAPS Pharmscitech. 12:255-264.

Bessler, Cornelius, Schmitt, Jutta, Maurer, Karl Heinz y Schmid, Rolf D. (2003). Directed evolution of a bacterial  $\alpha$ -amylase: toward enhanced pH performance and higher specific activity. Protein Science 12:2141–2149.

Devi, Lamabam Sophiya, Khaund, Polashree y Joshi, S. R. (2010). Thermostable amylase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan Range. *African Journal of Microbiology Research* 23:2534-2542.

Gangadharan, Dhanya, Sivaramakrishnan, Swetha, Nampoothiri, K. Madhavan y Pandey, Ashok. (2006). Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha-amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Food Technology and Biotechnology* 2:269–274

Gangadharan, Dhanya, Nampoothiri, K. Madhavan, Sivaramakrishnan, Swetha y Pandey, Ashok. (2009). Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158:653–662.

Goyal, Nidhi, Gupta, J.K. y Soni, S.K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology* 37:723–734.

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

Juwon, Arotupin Daniel y Emanuel, Ogunmalu Funso. (2012). Screening of fungal isolates from nigerian tar sand deposit in ondo state for novel biocatalysts. *Journal of Biological Sciences* 12:57-61

Krishnan, T., y Chandra, A. K. (1983). Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology* 46:430-437.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-684.

Malhotra, R., y Noorwez S. M, Satyanarayana T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase of extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology* 31:378–384.

Miller Gail Lorenz. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426–428

Najafi, Mohsen Fathi, Deobagkar, Dileep, y Deobagkar, Deepti. (2005). Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*. 2:349-354.

Pandey, Ashok, Nigam Poonam, Soccol Carlos R., Soccol Vanete T., Singh Dalel y Mohan, Radjiskumar. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry* 31: 135-152

Premila, Sasi J., y Dhandayuthapani, K. (2013). Optimization of  $\alpha$ -amylase production of *Bacillus stearothermophilus* KDP from Sago Industry Waste. *Int. Journal Applied BioResearch* 16:17-21

Quintero, Moreno Mónica, Montoya, Campuzano Olga Inés, y Gutiérrez, Sánchez Pablo. A. (2010). Purification and characterization of a  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus sp.* BBM1. *Dyna* 77: 31-38.

Rasooli, Iraj, Astaneh, Shakiba Darvish Alipoor, Borna, Hojjat y Barchini, Kamal Azizi. (2008). A thermostable  $\alpha$ -amylase producing natural variant of *Bacillus spp.* isolated from soil in Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 591-596

Ray, R. C., Kar, S, Nayak S., y Swain, M. R. (2008). Extracellular  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology* 22: 234–246

Roychoudhary, Siddhartha, Parulekar, Satish J., y Weigand, William A. (1989). Cell growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering* 33: 197–206.

Shaw, Jei-Fu, Lin Fu-Pang, Chen Su-Chiu y Chen Hasing-Chen. (1995). Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus sp.* Botanical Bulletin of Academia Sinica 36:195-200.

Teodoro, Carlos Eduardo de Souza y Martins, Meire Lelis Leal. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology 31:298-302.

Thippeswamy S., Girigowda K., y Mulimani V. H. (2006). Isolation and identification of amylase producing *Bacillus sp.* from dhal industry waste. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 43:295-298

van der Maarel, Marc J.E.C., van der Veen, Bart, Uitdehaag, Joost C.M., Leemhuis, Hans, y Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. Journal of Biotechnology 94:137-155.

Vaseekaran S., Balakumar S., y Arasaratnam V. (2010). Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ -amylase. Tropical Agricultural Research 1:1-11

Vihinen, Mauno y Mantsala, Pekka. (1989). Microbial amylolytic enzymes. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 24:329-418.

Vijayabaskar, P., Jayalakshmi D., y Shankar, T. (2012). Amylase production by moderately halophilic *Bacillus cereus* in solid state fermentation. African Journal of Microbiology Research 23:4918-4926.

Weisburg, William G., Barns Susan M., Pelletier, Dale A., y Lane, David J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173:697-703.

Wind, R. D., Buitelaar, R. M., Eggink, G., Huizing, H. J., Dijkhuizen, L. (1994). Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable  $\alpha$ -amylase producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41:155-162.

Xu D, Coté J. C. (2003) Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S 23S ITS nucleotide sequences. *Inter. Journal System and Evoluntary Microbiology* 53: 695-704.

Zar, Mian Sahib, Ali, Sikander y Shahid, Ahmad Ali. (2013). The influence of carbon and nitrogen supplementation on alpha amylase productivity of *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-14 using fuzzy-logic and two-factorial designs. *African Journal of Microbiology Research*. 2:120-129,

Zhang, Qixian, Tsukagoshi, Norihiro, Miyashiro, Shigeyoshi y Udaka, Shigezo. (1983). Increased production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Applied and Environmental Microbiology* 46:293-295.