

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología**

**“CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA  $\alpha$ -AMILASA DE LA CEPA TERMÓFILA  
*Bacillus licheniformis* BTA-03 AISLADA DE LOS GEISERES DE  
CALIENTES, CANDARAVE- TACNA, 2013”**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. CRISTINA ISABEL FERRER VILLENA**

**Para optar el Título Profesional de:**

**BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO**

**TACNA – PERÚ**

**2014**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 239

TÍTULO PROFESIONAL DE:  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico y Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad N° 7981-2014-FACI-UN/JBG ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: "CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA  $\alpha$ -AMILASA DE LA CEPA TERMÓFILA *Bacillus licheniformis* BTA-03 AISLADA DE LOS GEISERES DE CALIENTES, CANDARAVE-TACNA, 2013" el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE: Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras.  
SECRETARIO: Msc. Daladier Miguel Castillo Cotrina.  
VOCAL: Msc. Isabel Ancco Oliva.

Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día Miércoles 17 de Diciembre del 2014.

Presentado por la señorita Bachiller: CRISTINA ISABEL FERRER VILLENA, de la Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología. El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de sobresaliente. Votos a favor y promedio de 17.

Para ratifica lo detallado firman:

  
Dr. Segundo Manuel Alvarado  
Contreras  
**PRESIDENTE**

  
Msc. Daladier Miguel Castillo  
Cotrina  
**SECRETARIO**

  
Msc. Isabel Ancco Oliva  
**VOCAL**

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo principalmente a mi **madre**, por ser el pilar y el soporte de mi hogar, por demostrarme su cariño, valentía y amor hacia mí, por apoyarme incondicionalmente sin importar las diferencias de opiniones. A mi **padre**, a pesar de no vivir juntos sé que me apoyas en cada paso que doy y me alientas a ser la mejor en lo que me esté proyectando. A mi **hermana**, por ser la pequeña la cual seguirá mis enseñanzas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme dado la vida, por haberme dado a mis padres y por permitirme haber llegado hasta este momento de mi vida tan importante para mi desarrollo profesional.

A mi familia y amigos, por alentarme y guiarme en cada paso que doy.

A mi asesor Roberto Castellanos Cabrera, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado que pueda culminar el trabajo con éxito.

A mis profesores Mario Esparza Mantilla, Daladier Castillo Cotrina y Aristides Choquehuanca, por el apoyo moral y por la enseñanza brindada para mi formación científica.

A mi compañera Ariadna Zuñiga Llanos, por los ánimos de aliento, por la ayuda y los conocimientos ya que sin ella este trabajo no se hubiera realizado.

A Renato, por apoyarme y enseñarme que todo se puede si uno lo sueña.

A Julissa Naquiche Calero, Israel Salazar Quispe y Alonso Poma, amigos del grupo de investigación GIBEX los cuales estuvieron dispuestos a ayudarme en diferentes partes del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ya que gracias al aporte económico para el proyecto, contribuyó al desarrollo del trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Planteamiento del Problema.....	6
1.2 Hipótesis.....	7
1.3 Justificación.....	7
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo General.....	8
1.4.2 Objetivos Específicos.....	8
1.5 Marco Teórico.....	9
1.5.1 Aspectos Generales de las enzimas.....	9
1.5.2 Amilasas.....	15
1.5.2.1. $\alpha$ -amilasas.....	26
1.5.2.1.1. Estructura y actividad catalítica.....	32
1.5.2.1.2. Producción.....	41
1.5.2.1.3. Propiedades fisicoquímicas.....	47
1.5.2.2. $\beta$ -amilasas.....	52
1.5.2.3. Glucan $\alpha$ (1-4) glucosidasas.....	54
1.5.2.4. Isoamilasas.....	55

1.5.2.5.	Pululanasa	57
1.5.3	Almidón	58
1.5.3.1.	Amilosa	64
1.5.3.2.	Amilopectina	66
1.5.4	Aplicaciones de las amilasas	68
1.5.5	<i>Bacillus licheniformis</i>	78
1.5.6	Géiseres de Calientes	83
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	86
2.1	Material biológico	86
2.2	Métodos	86
2.2.1	Diseño de experimentos y tratamientos estadísticos de los datos	86
2.2.2	Obtención de <i>Bacillus licheniformis</i> BTA-03	88
2.2.3	Determinación de la actividad cualitativa de la hidrólisis del almidón	89
2.2.4	Determinación de la actividad cuantitativa de la $\alpha$ -amilasa	89
2.2.4.1.	Producción de enzima en medio líquido	89
2.2.4.2.	Purificación con Sulfato de amonio de la enzima $\alpha$ -amilasa	91
2.2.5	Caracterización enzimática	91

2.2.5.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	92
2.2.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	93
2.2.5.3. Determinación del $K_m$ y $V_{max}$ de la enzima.....	93
III. RESULTADOS .....	94
IV. DISCUSIÓN.....	119
V. CONCLUSIONES.....	126
VI. RECOMENDACIONES.....	128
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129
VIII. ANEXOS.....	147

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Clases de enzimas y tipos de reacciones.....	10
<b>Tabla 2:</b> Selección de las enzimas utilizadas en los procesos industriales.....	13
<b>Tabla 3:</b> Esquema de los principales enzimas amilolíticos clasificados funcionalmente. Se señala la actividad catalítica que poseen y los productos que generan. ....	21
<b>Tabla 4:</b> Fuentes microbianas de $\alpha$ -amilasa.....	29
<b>Tabla 5:</b> Peso molecular de $\alpha$ -amilasas y los microorganismos productores .....	32
<b>Tabla 6:</b> Porcentaje de amilosa y amilopectina de almidones de diferente origen.....	61
<b>Tabla 7:</b> Análisis de varianza simple del diámetro del halo alrededor de la colonia por tiempo .....	94
<b>Tabla 8:</b> Análisis de varianza del crecimiento bacteriano en la producción de $\alpha$ -amilasa en medio líquido.....	96
<b>Tabla 9:</b> Análisis de varianza del diámetro de la concentración de azúcares reductores por tiempo.....	99

<b>Tabla 10:</b>	Análisis de varianza de la concentración de proteínas en la producción de la $\alpha$ -amilasa.....	102
<b>Tabla 11:</b>	Análisis de varianza de la purificación (con y sin sulfato de amonio) frente a la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa .....	104
<b>Tabla 12:</b>	Prueba de Tukey para la comparación de la enzima purificada y no purificada frente a la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa.....	105
<b>Tabla 13:</b>	Análisis de varianza para actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa a diferentes pH.....	107
<b>Tabla 14:</b>	Análisis de varianza para actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas ( $^{\circ}$ C).....	110
<b>Tabla 15:</b>	Análisis de varianza para actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa a diferentes concentraciones de sustrato.....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Residuos catalíticos de la $\alpha$ -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> : resaltados en verde los residuos de ácido aspártico (Asp-206 y Asp- 297) y en negro el residuo de ácido glutámico (Glu-230) (Nielsen, & Borchert, 2000). Modificado de Protein Data Bank (PDB 6taa).....	23
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de inversión en $\beta$ -amilasas y glucan $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas. (Polaina, 2004).....	25
<b>Figura 4:</b> Estructura 3D de $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus</i> sp. dependiente del ión sodio (Na I, II y III). Se observan en azul el dominio A, en rojo el dominio B y en verde el dominio C (Nonaka et al., 2003).....	36
<b>Figura 5:</b> Amilosa (Martinez, 2005).....	66
<b>Figura 6:</b> Amilopectina (Martinez, 2005).....	67
<b>Figura 7:</b> Aspecto típico de las colonias de <i>B. licheniformis</i> en medio Luria- Bertani Agar (Ageitos, 2011).....	82

<b>Figura 8:</b>	Modelo ajustado de la regresión lineal de tiempo vs diámetro de la zona de hidrólisis del almidón.....	95
<b>Figura 9:</b>	Modelo ajustado de la regresión lineal de tiempo vs crecimiento bacteriano en la producción de la $\alpha$ -amilasa en el medio líquido.....	97
<b>Figura 10:</b>	Modelo ajustado de la regresión polinomial de tiempo vs concentración de azúcares reductores en la producción de la $\alpha$ -amilasa.....	100
<b>Figura 11:</b>	Modelo ajustado de la regresión polinomial de tiempo vs concentración proteínas en la producción de la $\alpha$ -amilasa .....	103
<b>Figura 12:</b>	Gráfico de medias de la actividad de la $\alpha$ -amilasa purificada y sin purificar con sulfato de amonio.....	106
<b>Figura 13:</b>	Modelo ajustado de la regresión polinomial de la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa vs el pH.....	109
<b>Figura 14:</b>	Modelo ajustado de la regresión polinomial de temperaturas vs la actividad enzimática (U/ml) de la $\alpha$ -amilasa.....	112
<b>Figura 15:</b>	Modelo ajustado de la regresión polinomial de la concentración de sustratos vs la velocidad de la $\alpha$ -amilasa. .....	115

**Figura 16:** Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustratos vs la inversa de la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa.....117

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1:</b> Fotografía del diámetro del halo alrededor de la colonia a las 24, 48 y 96 horas .....	147
<b>ANEXO 2:</b> Fotografía de la producción de la enzima a partir de <i>Bacillus licheniformis</i> BTA-03 en medio líquido.....	147
<b>ANEXO 3:</b> Curva patrón de la concentración de azúcares reductores..	148
<b>ANEXO 4:</b> Curva patrón de la concentración de proteínas.. ..	149
<b>ANEXO 5:</b> Curva patrón de la concentración de almidón.....	150
<b>ANEXO 6:</b> Datos de la actividad enzimática cualitativa de la $\alpha$ -amilasa ... ..	151
<b>ANEXO 7:</b> Datos del crecimiento bacteriano de la cepa en la producción de la $\alpha$ -amilasa.....	152
<b>ANEXO 8:</b> Datos de la concentración de azúcares reductores en la producción de la $\alpha$ -amilasa .....	153
<b>ANEXO 9:</b> Datos de la concentración de proteínas en la producción de la $\alpha$ -amilasa.....	154
<b>ANEXO 10:</b> Datos de la purificación con sulfato de amonio de la $\alpha$ -amilasa. ....	155
<b>ANEXO 11:</b> Datos del efecto del pH en la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa.....	156

<b>ANEXO 12:</b> Datos del efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa.....	157
<b>ANEXO 13:</b> Datos del efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa.....	158
<b>ANEXO 14:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión lineal de la actividad cualitativa (diámetro vs. Tiempo).....	159
<b>ANEXO 15:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial del crecimiento bacteriano en la producción de la $\alpha$ -amilasa en medio líquido .....	160
<b>ANEXO 16:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la concentración de azúcares reductores en la producción de la $\alpha$ -amilasa en medio líquido. ....	161
<b>ANEXO 17:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la concentración de proteínas en la producción de la $\alpha$ -amilasa en medio líquido .....	162
<b>ANEXO 18:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa a diferentes pH.....	163

<b>ANEXO 19:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ).....	164
<b>ANEXO 20:</b> Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión lineal de la inversa de la concentración de sustratos vs la inversa de la velocidad de la $\alpha$ -amilasa.....	165

## RESUMEN

La enzima amilasa ha recibido gran cantidad de atención a nivel mundial. Los microorganismos que pueden producir  $\alpha$ -amilasas tienen aplicación comercial en industrias almidoneras tales como en alimento, textiles y detergentes, drogas y productos farmacéuticos, elaboración de cerveza y finos productos químicos.

En este trabajo se estudió las características enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa de la cepa *Bacillus licheniformis* BTA-03 aislada de los géiseres de Calientes-Candarave, con la finalidad de obtener una enzima que podría ser usada industrialmente. Se midió la actividad enzimática cualitativamente por medio de halos, se produjo la enzima en medio líquido cuando se hizo la fermentación de *Bacillus licheniformis* BTA-03, se purificó con sulfato de amonio, se obtuvo el efecto del pH y temperatura por medio de la actividad enzimática (U/ml) por el método del lugol, y se obtuvo el  $K_m$  y  $V_{max}$  de la  $\alpha$ -amilasa.

La temperatura óptima fue de 58 °C con una actividad de 10,669 U/ml, el pH óptimo fue de 6,7 con una actividad de 4,14 U/ml y la  $V_{max}$  y el  $K_m$  estimado fueron 229,537  $\mu$ g de almidón hidrolizado/minuto y 8,724 mg/ml de la  $\alpha$ -amilasa respectivamente.

## ABSTRACT

Amylase enzyme has received a lot of attention worldwide. The microorganisms that can produce  $\alpha$ -amylases have commercial application in starch industries such as food, textiles and detergents, drugs, pharmaceuticals, brewing and fine chemicals.

In this paper the enzymatic characteristics of the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* BTA-03 strain isolated from geysers hot-Candarave, in order to obtain an enzyme that could be used industrially was studied. The enzyme activity was measured qualitatively by halos, occurred the enzyme in liquid medium when the *Bacillus licheniformis* BTA-03 was fermentation, purified with ammonium sulfate, the effect of pH and temperature was obtained through activity enzyme (U / ml) by the method of lugol, and  $K_m$  and  $V_{max}$  were obtained from the  $\alpha$ -amylase.

The optimum temperature was 58 ° C with an activity of 10,669 U/ml, the optimal pH was 6,7 with an activity of 4,14 U / ml and  $V_{max}$  and  $K_m$  were estimated 229,537  $\mu$ g hydrolyzed starch/min and 8,724 mg/ml of  $\alpha$ -amylase respectively.

## I. INTRODUCCIÓN

Los procesos catalizados por enzimas en la industria presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (Annamalai et al, 2011). Dentro de las enzimas más explotadas se encuentran las amilasas; estas actualmente representan cerca del 20 y 25 % del mercado mundial de las enzimas (Deb et al, 2013; Quinteros, 2012; Rubiano, 2006). La industria está demandando continuamente procesos más limpios y económicos, por lo que surge la necesidad de cubrir esta necesidad. Los suelos, géiseres y hábitat exóticos poseen una inmensa diversidad microbiana con características biotecnológicas.

Es por ello que las enzimas amilasas han recibido gran cantidad de atención debido a su importancia tecnológica y beneficios económicos (Annamalai et al, 2011; Fooladi & Sajjadian, 2012). La enzima tiene un mejor rol en la utilización de polisacáridos. Los microorganismos que producen  $\alpha$ -amilasas tienen aplicación comercial en industrias tal como en industrias de alimentos, textiles y detergentes, drogas y productos farmacéuticos, elaboración de cerveza y finos productos químicos

(Annamalai et al, 2011; Fooladi & Sajjadian, 2012; Latorre, 2008, Rubiano, 2006; Vargas & Silver, 2002). Aunque las amilasas degradantes de los granos crudos de almidón y las bacterias han sido frecuentemente reportadas, informes sobre amilasas obtenidas de bacterias termófilas capaces de degradar granos crudos de almidón son limitados. Las industrias almidoneras requieren una resistencia de las enzimas amilolíticas a una alta temperatura (60 °C), para su licuefacción del almidón (Ashger et al, 2006, Ponce & Pérez, 2002).

Las amilasas son enzimas intra o extracelulares que promueven la hidrólisis de enlaces glucosídicos presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos (Van der Maarel et al., 2002), por lo que la aplicación de estas enzimas es muy variada. Las  $\alpha$ -amilasas (1,4-a-D-glucano-4- glucanohidrolasa) son un grupo de enzimas de amplia difusión que cataliza la hidrólisis de la  $\alpha$ -1,4 de enlaces glucosídicos del almidón crudo y almidón soluble y así genera pequeñas dextrinas y oligosacáridos (Annamalai et al, 2011; Fooladi & Sajjadian, 2012; Rubiano, 2006; Vargas & Silver, 2002).

Las amilasas son producidas por animales, plantas y microorganismos como bacterias y hongos (Latorre, 2008, Rubiano, 2006). Sin embargo, los rendimientos de amilasas de plantas y animales son muy bajos, y presentan grandes inconvenientes. Por ello, las mejores fuentes productoras de amilasas son bacterias y hongos, no solo porque sus amilasas son generalmente extracelulares, sino que además presentan altos niveles de expresión (Pandey et al., 2000). En este sentido, los principales microorganismos productores de amilasas son *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *Aspergillus* sp. (Vihinen & Mantsala, 1989, Pandey et al., 2000).

En este trabajo, se realizó una caracterización enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* BTA-03, evaluando la actividad cualitativa, producción de la enzima, purificación, el efecto del pH, la temperatura, y la concentración del almidón sobre la actividad enzimática.

## 1.1 Planteamiento del Problema

Las enzimas degradadoras de almidón como las amilasas han recibido gran cantidad de atención debido a su importancia tecnológica percibida y beneficios económicos. La  $\alpha$ -amilasa es una enzima industrial muy importante, de aplicación comercial en industrias tal como comidas y bebidas, textiles y detergentes, drogas y productos farmacéuticos. El almidón producido en industrias requiere una resistencia a una alta temperatura (60 °C) de las enzimas amilolíticas. Las amilasas que resisten a esta temperatura presentan un gran interés para el futuro de las industrias enzimáticas, se ha generado una gran tendencia en la búsqueda de nuevas cepas termófilas como fuente de nuevas enzimas resistentes a temperaturas industriales, por lo tanto se plantea la siguiente pregunta:

**¿Qué características enzimáticas tiene la  $\alpha$ -amilasa de la cepa termófila *Bacillus licheniformis* BTA-03 aislada de los géiseres de Calientes, Candarave- Tacna, 2013?**

## 1.2 Hipótesis

La cepa *Bacillus licheniformis* BTA- 03 produce alfa amilasa que presenta una actividad enzimática similar o igual a la cepa *Bacillus* sp. BBM1.

## 1.3 Justificación

Dada la demanda de amilasas en la industria (almidonera, alimentaria, de procesos, farmacéutica, detergentes, etc.) para la degradación y/o procesamiento de almidón, las condiciones climático y ambientales de los géiseres de Calientes-Candarave, así como la poca exploración de dicha región para la búsqueda de microorganismos productores de amilasas, este trabajo propone caracterizar las  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus licheniformis* BTA-03 la cual fue aislada de los géiseres, con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial aplicación industrial.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

Caracterizar enzimáticamente la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* BTA-03 aislado de los géiseres de Calientes-Candarave Tacna, 2013

### 1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad cualitativa de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* BTA-03.
- Producir la enzima  $\alpha$ -amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* BTA-03.
- Purificar con sulfato de amonio la enzima producida.
- Determinar el pH óptimo de la enzima  $\alpha$ -amilasa mediante la actividad enzimática.
- Determinar la temperatura óptima de la enzima  $\alpha$ -amilasa mediante la actividad enzimática.
- Determinar la  $V_{\max}$  y el  $K_m$  de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

## **1.5 Marco Teórico**

### **1.5.1 Aspectos Generales de las enzimas**

En todos los procesos vitales están implicadas las enzimas, las actividades que desempeñan son sumamente importantes; las enzimas son moléculas biológicas responsables de todas las interconversiones químicas y tienen una variada diversidad que va desde el mantenimiento de la vida y su propagación hasta la utilización de recursos naturales, la obtención de los alimentos, la producción de medicamentos, producción de etanol, producción de detergentes, el tratamiento de residuos domésticos e industriales y otras aplicaciones de muy diversos campos (Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002; Krishna et al., 2011).

Desde el antiguo Egipto el hombre ya preparaba alimentos mediante los procesos de fermentación muy rudimentarios y estuvo presente en la producción de queso, masa madre, vino, cuero, ropa, entre otros; basándose en el crecimiento espontáneo de microorganismos o enzimas

presentes en estas preparaciones; pero hoy en día las fermentaciones industriales abarcan productos tan disímiles como ácidos orgánicos, solventes, esteroides, enzimas, etc. (Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002).

**Tabla 1:** Clases de enzimas y tipos de reacciones

EC N°	Clases de enzima	Perfil de la reacción
<b>EC1</b>	Oxidoreductasa	Las reacciones de oxidación implican la transferencia de electrones de una molécula a otra. En los sistemas biológicos vemos generalmente la eliminación de hidrógeno del sustrato. Enzimas típicas de esta clase son llamadas deshidrogenasas. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa cataliza reacciones del tipo $R-CH_2OH + AR-CHO + H_2A$ , donde A es una molécula aceptora. Si A es oxígeno, las enzimas pertinentes se llaman oxidasas o lacasas; si A es peróxido de hidrógeno, las enzimas pertinentes se llaman peroxidasas.
<b>EC2</b>	Transferasas	Esta clase de enzimas cataliza la transferencia de grupos de átomos de una molécula a otra. Aminotransferasas o transaminasas promueve la transferencia de un grupo amino de un aminoácido a un alfa-oxoácido.
<b>EC3</b>	Hidrolasas	Las hidrolasas catalizan la hidrólisis, la escisión de sustratos por el agua. Las reacciones incluyen la escisión de enlaces peptídicos en proteínas, enlaces glicosídicos en hidratos de carbono, y los enlaces éster en los lípidos. En general, las moléculas más grandes se descomponen en fragmentos más pequeños por hidrolasas.

<b>EC4</b>	Liasas	Las liasas catalizan la adición de grupos de dobles enlaces o la formación de dobles enlaces a través de la eliminación de los grupos. Así, los lazos se escinden usando un principio diferente de la hidrólisis. Pectato liasas, por ejemplo, se dividen los enlaces glicosídicos por la eliminación beta.
<b>EC5</b>	Isomerasas	Isomerasas catalizan la transferencia de grupos de una posición a otra en la misma molécula. En otras palabras, estas enzimas cambian la estructura de un sustrato por la reordenación de sus átomos.
<b>EC6</b>	Ligasas	Ligasas unen moléculas mediante enlaces covalentes. Estas enzimas participan en reacciones biosintéticas donde se forman nuevos grupos de bonos. Tales reacciones requieren la entrada de energía en forma de cofactores tales como ATP

Fuente: Gurung et al., 2013

Las enzimas son sustancias biológicas o macromoléculas biológicas que son producidas por un organismo vivo que actúa como un catalizador para llevar a cabo una reacción bioquímica específica. Estas son como los catalizadores químicos en una reacción química que ayuda a acelerar las reacciones biológicas / bioquímicas en el interior como en el exterior de la célula y son generalmente conocidos como “biocatalizadores”(Steffolani, 2012; Gurung et al., 2013). Debido a su amplia gama de actividades basado en su

naturaleza de reacción enzimática se estas clasificando de acuerdo a su reacción catalítica enzima como se muestra en la Tabla 1. El número de la Comisión de Enzimas (número CE) es un esquema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. Como un sistema de nomenclatura de las enzimas, cada número CE se asocia con un nombre recomendado para la enzima respectiva. La Unión Internacional de Bioquímica (IUB) inició estándares de nomenclatura de las enzimas que recomiendan que los nombres de las enzimas indiquen tanto el sustrato a actuar y el tipo de reacción catalizada. De acuerdo con la comisión de la enzima Las enzimas se divide en 6 partes : (i) oxidorreductasa (CE1), (ii) transferasa (CE2), (iii) hidrolasa (CE3), (iv) liasa (CE4), (v) isomerasa (CE5) y (vi) ligasa (CE6). En la Tabla 2 se da ejemplos de algunas clases de enzimas industriales importantes. Así la mayoría de las enzimas industriales utilizadas actualmente son hidrolítica en acción, que se utiliza para la degradación de diversas sustancias naturales. (Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002).

**Tabla 2:** Selección de las enzimas utilizadas en los procesos industriales

<b>c</b>	<b>Clases</b>	<b>Industrias enzimáticas</b>
1	Oxidoreductasa	Catalasa, glucosa oxidasa, lacasa.
2	Transferasas	Fructosiltransferasa, glucosiltransferasa.
3	Hidrolasas	Amilasa, celulasa, lipasa, mananasa, pectinasa, fitasa, proteasa, pululanasa, xilanasas.
4	Liasas	Pectato liasas, alfa-acetolactato, descarboxilasas.
5	Isomerasas	Glucosa isomerasa, epimerasa, mutasa, liasa, topoisomerasa.
6	Ligasas	Argininosuccinato, glutation sintetasa.

Fuente: Kirk et al., 2002

Los procesos catalizados por enzimas en la industria presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (Annamalai et al., 2011). Las enzimas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de los tejidos animales, vegetales o mediante procesos de fermentación. Pero debido a que las

aplicaciones industriales de las enzimas requieren que estas sean producidas a gran escala y bajo costo, el empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido cayendo, a favor de las enzimas de origen microbiano (Annamalai et al., 2011; Cortéz, 2004; Eliézer, 2013). Las enzimas microbianas tienen altas tasas catalíticas y trabajan en solución acuosa. Según los estándares de la industria, sólo se requieren temperaturas y presiones moderadas. Por lo tanto, la explotación industrial de las enzimas está haciendo el desarrollo de procesos más limpios y ecológicos posibles. Además, su exquisita especificidad mantiene reacciones secundarias no deseadas a un mínimo, maximizando el rendimiento (Deb et al., 2013; Naidu & Saranraj, 2013).

Entre las enzimas, las proteasas siguen es el tipo de enzima dominante en el mercado, debido a su amplio uso en las industrias de detergente y productos lácteos. Las amilasas y celulasas, utilizadas en industrias tales como la industria del almidón, textiles, detergentes y hornear, representan el segundo grupo más importante. En las industrias técnicas representan el mayor consumo de enzimas industriales y esta

comprende a las industrias de detergentes, almidón, textiles y alcohol de combustible. En general, el valor estimado de la utilización mundial de enzimas industriales ha crecido de mil millones dólares en 1995, \$ 1,5 mil millones en 2000 y a 3,3 mil millones de dólares en 2010. Se espera llegar a más de mil millones de dólares en el 2015. Este crecimiento, sin embargo, se ha estancado en algunas de las principales industrias técnicas como la industria de los detergentes. El crecimiento más rápido en la última década se ha visto en la industria de panadería y alimentos para animales, pero el crecimiento también se está generando desde aplicaciones establecidas en una gran cantidad de otras industrias que van desde la síntesis orgánica de papel y de la pulpa y el cuidado personal (Cortéz, 2004; Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002; Naidu & Saranraj, 2013).

### **1.5.2 Amilasas**

La historia de las amilasas se inició en 1811 cuando la primera enzima que degrada el almidón fue descubierta por Kirchoff. Esto fue seguido por varios informes de amilasas

digestivas y amilasas de malta. La primera enzima producida industrialmente fue una amilasa a partir de una fuente fúngica en 1894, que fue utilizado como una ayuda farmacéutica para el tratamiento de trastornos digestivos. Fue mucho más tarde en 1930, que Ohlsson sugirió la clasificación de enzimas digestivas de almidón en la malta como a- y b -amilasas de acuerdo con el tipo anomérico de azúcares producidos por la reacción de la enzima (Deb et al., 2013; Naidu & Saranraj, 2013; Pandey et al., 2010).

Actualmente las amilasas se encuentran entre las enzimas más estudiadas ya que tienen un gran valor comercial en varios campos de las aplicaciones biotecnológicas que van desde química clínica, medicinal y de análisis hasta en la industria de alimentos, de fermentación, de textil, farmacéutica, en la industria del papel y tienen una amplia variedad de aplicaciones que van desde la conversión de almidón en jarabes de azúcar, a la producción de ciclodextrinas para la industria farmacéutica (Deb et al., 2013; Krishna et al., 2011; Monteiro, 2010; Pandey et al., 2010).

Las amilasas son enzimas que hidrolizan las moléculas de almidón para dar diversos productos que incluyen dextrina y polímeros cada vez más pequeños compuestos por unidades de glucosa (Krishna et al., 2011; Naidu & Saranraj, 2013; Monteiro, 2010; Latorre, 2008; Rubiano, 2006; Vargas & Silver, 2002).

Las amilasas se pueden obtener a partir de varios hongos, levadura, animales, plantas, bacterias y actinomicetos; sin embargo, la enzima de fuentes fúngicas y bacterianas ha dominado las aplicaciones en los sectores industriales; debido al corto período de crecimiento, la diversidad bioquímica y la facilidad con la que las concentraciones de enzimas pueden ser aumentados por la manipulación del medio ambiente y genética. Las enzimas procedentes de fuentes microbianas generalmente satisfacen las demandas industriales, además, tienen la vida útil más larga y pueden ser almacenados durante semanas sin pérdida significativa de la actividad (Deb et al., 2013; Krishna et al., 2011; Naidu & Saranraj, 2013; Pandey et al., 2010).

Las amilasas, al igual que todas las enzimas conocidas, se clasifican mediante un código de cuatro números (EC W.X.Y.Z) de acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC, por sus siglas en inglés), los cuales indican: W, tipo de reacción catalizada (1 a 6); X, sustrato general o grupo implicado; Y, sustrato específico o coenzima y Z, número de serie. Por lo que las enzimas con código EC 3.2.1, como las amilasas, son aquellas que hidrolizan enlaces O- o S-glucosídicos (Montor, 2013). Asimismo se clasifican como endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificantes y transferasas., de acuerdo al sitio de hidrólisis que efectúan sobre la molécula de almidón, glucógeno y otros polisacáridos. Las endoamilasas degradan los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 que se encuentran en el interior de la molécula de amilosa y amilopectina, esta acción hace que la formación de oligosacáridos lineales y ramificados, de diversas longitudes de cadena. Se identifica como endoamilasa a la  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1), Las exoamilasas hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de la molécula, generando productos de bajo peso molecular, en este grupo se incluyen las  $\beta$ -amilasas (EC 3.2.1.2) que

generan disacáridos de glucosa (maltosa) y las glucoamilasas (E.C.3.2.1.3) que generan residuos de glucosa. Las enzimas desramificantes, que engloban a pululanasa (EC 3.2.1.41) e isoamilasas (EC 3.2.1.68), son enzimas que hidrolizan exclusivamente los enlaces  $\alpha$ -1,6. Las pululanasa, degradan los enlaces  $\alpha$ -1,6 de glucógeno, amilopectina y pululano (polisacárido extracelular producido por *Aureobasidium pullulans*). Las isoamilasas degradan completamente el glucógeno y se distinguen de las pululanasa en que no tienen capacidad para degradar el pululano. Por último, las ciclodextringlicosiltransferasas degradan enlaces  $\alpha$ -1,4 y son capaces de formar nuevos enlaces glicosídicos generando ciclodextrinas (Latorre, 2008; Montor, 2013; Van der Maarel et al., 2002).

En 1991, Bernard Henrissat propuso una clasificación de los enzimas glicósido hidrolasas. Estas enzimas son las responsables de hidrolizar los enlaces glicosídicos en carbohidratos. La clasificación se basa en la similitud de las secuencias proteicas de las glicósido hidrolasas y agrupa las enzimas dentro de distintas

familias. Cada familia refleja las características estructurales y la relación evolutiva del conjunto de enzimas que agrupa. A su vez, las familias se asocian en grupos denominados clanes. Cada clan intenta agrupar a las familias de enzimas que poseen un origen común, que presentan similitudes significativas en su estructura terciaria y que conservan residuos y mecanismos catalíticos. Las enzimas amilolíticas se distribuyen en tres familias: familias 13, 14 y 15 (Tabla 3). La familia 13, que se engloba en el clan GH-H, incluye la mayoría de enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, pululanasas, isoamilasas y ciclodextringlicosiltransferasas). La familia 14 contiene a las  $\beta$ -amilasas y no se engloba en ningún clan. Finalmente, la familia 15, que pertenece al clan GH-L, incluye a las glucoamilasas (Henrissat, 1991; Latorre, 2008).

**Tabla 3:** Esquema de las principales enzimas amilolíticas clasificados funcionalmente. Se señala la actividad catalítica que poseen y los productos que generan.

FAMILIA (Clan)	ENZIMA	ACTIVIDAD	PRODUCTOS
13 (GH-H)	$\alpha$ -AMILASA (EC 3.2.1.1)	Endoamilasa. Degrada, aleatoriamente, enlaces $\alpha$ -1,4 en el interior de las moléculas de almidón.	Oligosacáridos de longitud variable.
	$\alpha$ -GLUCOSIDASA (EC 3.2.1.3)	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Residuos de glucosa, con $\alpha$ -configuración.
	PULULANASA (EC 3.2.1.41)	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón, pululano y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
	ISOAMILASA (EC 3.2.1.68)	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
14(GH-L)	$\beta$ -AMILASA (EC 3.2.1.2)	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Disacáridos de glucosa (maltosa).
15 (GH-L)	GLUCOAMILASA (EC	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el	Residuos de glucosa, con $\beta$ -

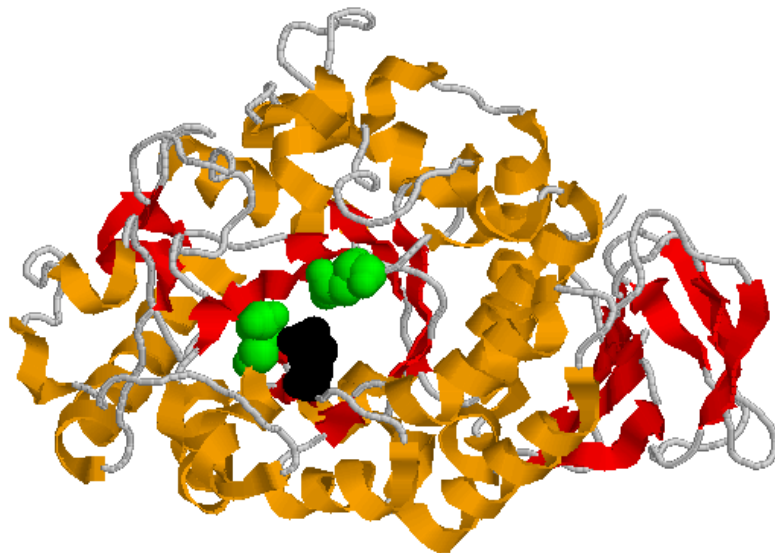
---

3.2.1.3) extremo no reductor de configuración.  
las moléculas de  
almidón

---

Fuente: Henrissat (1991).

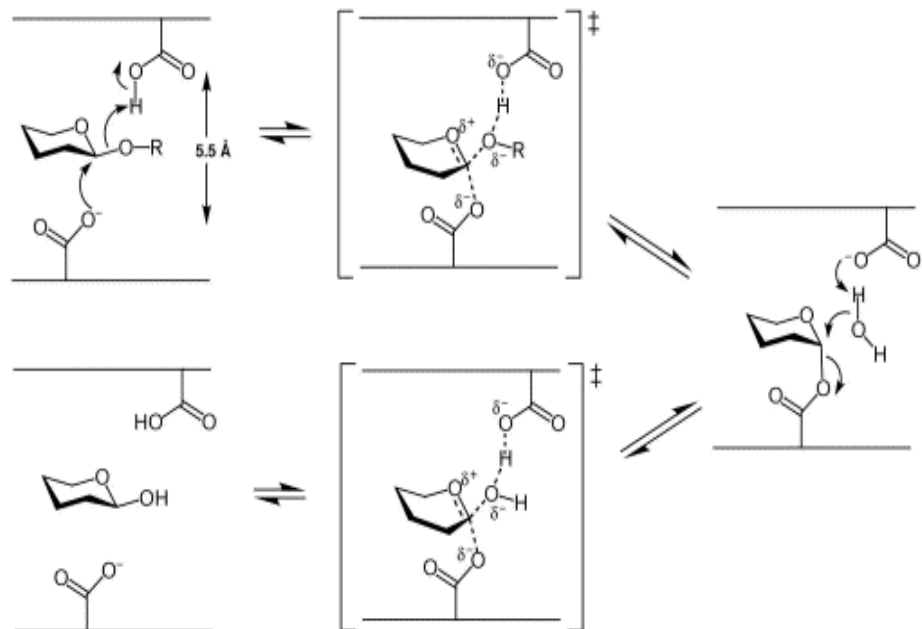
Todas las amilasas tienen en común la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) o  $\alpha$ -(1-6), produciendo unidades  $\alpha$ -anoméricas u oligosacáridos, además poseen una estructura formada por ocho  $\alpha$  hélices y ocho hojas  $\beta$  que se disponen en forma circular, a este plegamiento se le conoce como barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> o TIM barril debido a que fue observado por primera vez en la triosa fosfato isomerasa (TIM o TPI por sus siglas en inglés) (Nonaka *et al.*, 2003). El plegamiento que se conoce como TIM barrel está fuertemente conservado en todas las amilasas microbianas. Dentro del túnel que forma el TIM barrel se localizan dos residuos de ácido aspártico (Asp) y un residuo de ácido glutámico (Glu) que son responsables de la actividad amilolítica (Fig. 1) (Prasanna, 2005).



**Figura 1:** Residuos catalíticos de la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*: resaltados en verde los residuos de ácido aspártico (Asp-206 y Asp- 297) y en negro el residuo de ácido glutámico (Glu-230). Modificado de Protein Data Bank (PDB 6taa) (Nielsen, & Borchert, 2000).

En la mayoría de las amilasas, el mecanismo catalítico consiste en un doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$  (Van der Maarel et al., 2002). Durante este proceso, uno de los residuos de Asp realiza un ataque nucleofílico, al carbono anomérico (carbono  $\alpha$ ) del sustrato, formándose de manera transitoria un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Posteriormente, el residuo de Glu,

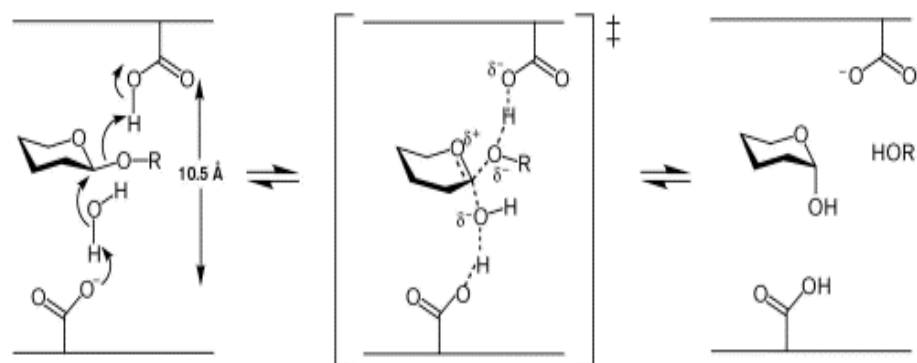
actúa como ácido/base, y sustrae un protón de una molécula de agua que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Polaina, 2004), liberándose así la molécula hidrolizada (Fig. 2).



**Figura 2:** Mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$  (Polaina, 2004).

En las  $\beta$ -amilasas y las glucan  $\alpha$ -(1-4)- glucosidasas, a diferencia del resto de las amilasas, los residuos responsables de la actividad son dos Glu (Mikami et al., 1994), por lo que no hidrolizan los sustratos mediante un mecanismo de doble

desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$ , sino que emplean un mecanismo de inversión, por lo que el producto liberado adquiere una configuración  $\beta$  (Horváthová et al., 2001). El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido/base que involucra los dos residuos de Glu. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del grupo acetal (Polaina, 2004) (Fig.3).



**Figura 3:** Mecanismo de inversión en  $\beta$ -amilasas y glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas (Polaina, 2004).

De las amilasas enlistadas en la tabla 3, las más importantes a nivel industrial son las  $\alpha$ -amilasas, las  $\beta$ -amilasas, las glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas, las isoamilasas y las pululaninas (Montor, 2013).

#### **1.5.2.1 $\alpha$ -amilasa**

Las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1), son enzimas extracelulares denominadas endoenzimas porque catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos internos  $\alpha$ -(1-4) presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos, asimismo hidrolizan enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) en un menor porcentaje que el  $\alpha$ -(1-4) (Annamalai et al., 2011; Bautista, 1997; Beltrán & Herreño, 2010; Fooladi & Sajjadian, 2010; Martínez, 2005; Montor, 2013; Monteiro et al., 2012; Naidu & Saranraj, 2013; Prakash & Jaiswal, 2010; Prasanna et al., 2013; Van der Maarel et al., 2002; Vargas & Silver, 2002).

La  $\alpha$ -amilasa puede ser obtenida de varias fuentes, tales como plantas, animales y

microorganismos (Bautista, 1997; Deb et al., 2013; Fooladi & Sajjadian, 2010; Gurung et al., 2013; Montor, 2013; Monteiro et al., 2010; Naidu & Saranraj, 2013; Pandey et al., 2000; Prakash & Jaiswal, 2010). Hoy en día un gran número de  $\alpha$ -amilasas microbiana están disponibles comercialmente y han sustituido casi por completo la hidrólisis química del almidón en la industria del procesamiento de almidón. Las amilasas de microorganismos tienen un amplio espectro de aplicaciones industriales, ya que son más estables que cuando se prepara  $\alpha$ -amilasas de plantas y animales. Las enzimas de fuentes fúngicas y bacterianas han dominado las aplicaciones en los sectores industriales (Monteiro et al., 2010; Naidu & Saranraj, 2013; Pandey et al., 2000). En la tabla 4 enumera importantes fuentes microbianas de  $\alpha$  – amilasa.

En cuanto a la  $\alpha$ -amilasa de fuentes bacterianas se deriva principalmente del género

*Bacillus*. Las  $\alpha$ -amilasas producidas a partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Bacillus amyloliquefaciens* se encuentra una aplicación potencial en una serie de procesos industriales tales como en alimentos, la fermentación, los textiles y las industrias de papel. (Deb et al., 2013; Monteiro et al., 2010; Pandey et al., 2000; Prakash & Jaiswal, 2010). Así también *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus amyloliquefaciens* son conocidos por ser buenos productores de  $\alpha$ -amilasa termoestable, y éstos han sido ampliamente utilizados para la producción comercial de la enzima para varias aplicaciones (Monteiro et al., 2010; Prakash & Jaiswal, 2010).

Las fuentes de hongos se limitan a los aislados terrestres, principalmente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Monteiro et al., 2010; Pandey et al., 2000). *A. oryzae* ha recibido mayor atención como un agente favorable por su

capacidad para secretar una gran cantidad de  $\alpha$ -amilasas para la producción industrial. *Aspergillus niger* tiene importantes capacidades hidrolíticas en la producción de  $\alpha$ -amilasa y debido a su tolerancia de la acidez ( $\text{pH} < 3$ ), que permite la evitación de la contaminación bacteriana (Bautista, 1997; Monteiro et al., 2010). El hongo termófilo de *Thermomyces lanuginosus* es un excelente productor de la amilasa de  $\alpha$ -amilasa termoestable (Monteiro et al., 2010).

**Tabla 4:** Fuentes microbianas de  $\alpha$ -amilasa

Microorganismos
<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>Alteromonas haloplanetis</i>
<i>Anaerobic bacterium</i>
<i>Archaeobacterium pyrococcus woesei</i>
<i>Aspergillus sp.</i>
<i>A. awamori</i>
<i>A. flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>
<i>A. kawachi</i>
<i>A. niger</i>
<i>A. oryzae</i>
<i>A. usanii</i>

***Bacillus* sp**

***B. acidocoldarius***

***B. amyloliquefaciens***

***B. brevis***

***B. circulans***

***B. coagulans***

***B. flavothermus***

***B. globisporus***

***B. licheniformis***

***B. megaterium***

***B. stearothermophilus***

***B. subtilis***

***Chloroflexus aurantiacus***

***Clostridium acetobutylicum***

***C. butricum***

***C. thermohydrosulfuricum***

***C. thermosulfurogenes***

***Eubacterium* sp.**

***Filobasidium capsuligenum***

***Halobacterium halobium***

***H. salinarium***

***Humicola insolens***

***H. lanuginosa***

***H. stellata***

***Lactobacillus brevis***

***L. cellobiosus***

***Malbrachea pulchella* var. *sulfurea***

***Micrococcus luteus***

***M. varians***

***Micromonospora vulgaris***

***Mucor pusillus***

***Myceliophthora thermophila***

***Myxococcus coralloides***

***Nocardia asteroides***

***Penicillium brunneum***

***Pseudomonsa stutzeri***

***Pycnoporus sanguineus***

***Pyrococcus woesei***

***Rhizopus* sp.**

***Scytalidium* sp.**

***Schizophyllum commune***

***Talaromyces thermophilus***

***Thermus* sp.**

*Thermoactinomyces sp.*  
*T. vulgaricus*  
*Thermococcus profundus*  
*Thermomonospora viridis*  
*Thermonospora curvata*  
*T. vulgaris*  
*Thermomyces lanuginosus*

Fuente: Pandey et al, 2000

El peso molecular de las  $\alpha$ -amilasas varía entre 10 y 139 kDa (Vihinen & Mantsala, 1989). La  $\alpha$ -amilasa más pequeña, hasta ahora conocida, la produce *Bacillus caldolyticus* y tiene un peso molecular de 10 kDa. Por lo general, el peso molecular de las  $\alpha$ -amilasas bacterianas se encuentra entre 50 y 60 kDa (tabla 5).

**Tabla 5:** Peso molecular de  $\alpha$ -amilasas y los microorganismos productores.

<b>Microorganismo</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
<i>B. licheniformis</i>	60
<i>B. sp.</i> BBM1	77,6
<i>Thermus sp.</i>	59
<i>Bacillus sp.</i>	66
<i>B. cereus</i> MS6	27
<i>B. amyloliquefaciens</i>	58
<i>B. sp.</i> BKL20	35

Fuente: Montor, 2013.

### **La familia, estructura y actividad catalítica**

La mayoría de las enzimas que convierten el almidón pertenecen a una familia basada en la homología de secuencia aminoacídica: la familia de  $\alpha$ -amilasa o de la familia 13 de la glicosil hidrolasas de acuerdo con la clasificación de Henrissat (1991). Este grupo comprende aquellas enzimas que tengan las siguientes características: (i) que actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos e hidrolizan este

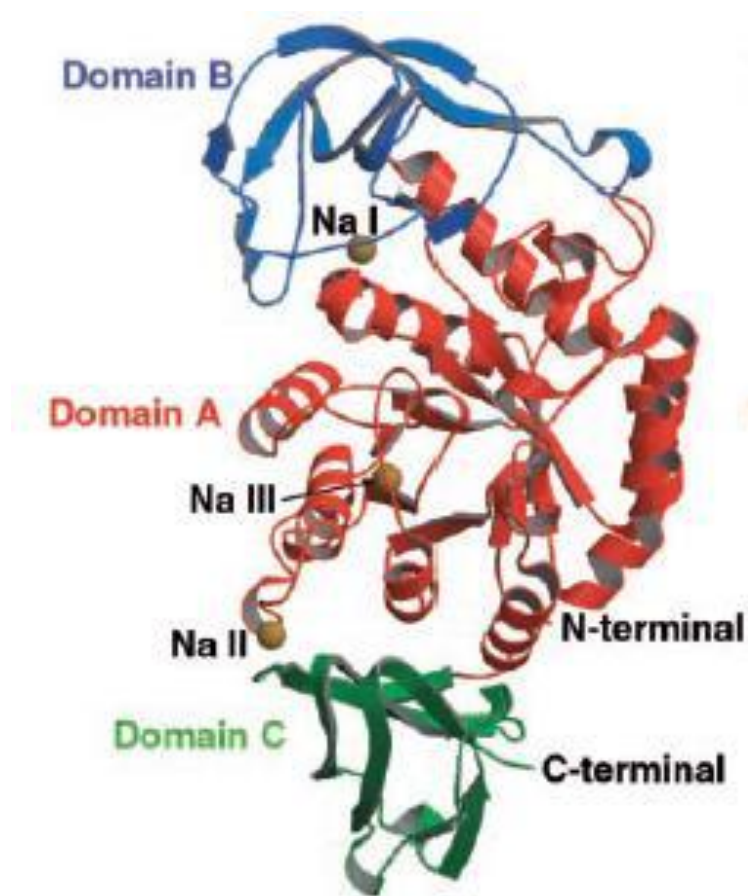
enlace para producir  $\alpha$ -anoméricos monosacáridos u oligosacáridos (hidrólisis), forma  $\alpha$ ,1-4 o  $\alpha$ ,1-6 enlaces glicosídicos (transglicosilación) , o una combinación de ambas actividades; (II) poseen una estructura  $(\beta/\alpha)_8$  o barril TIM, estructura que contiene los residuos del sitio catalítico; la mayoría se componen de tres dominios; (III) tienen cuatro regiones altamente conservadas en su secuencia primaria que contienen los aminoácidos que forman el sitio catalítico, así como algunos aminoácidos que son esenciales para la estabilidad de la conservación de la topología del barril TIM (Prasana et al., 2013; Van der Maarel et al., 2002).

Las  $\alpha$ -amilasas están conformadas en tres dominios, un barril  $(\alpha/\beta)_8$  (dominio A, el dominio más grande), un dominio adicional insertado por enlaces disulfuros en el dominio A (dominio B) que consiste en un “loop” largo que se destaca entre la hoja  $\beta$ 3 y la  $\alpha$  hélice 3 del dominio A y el dominio independiente C-

terminal (dominio C) con una hoja  $\beta$  unida al dominio A, el cual presenta una función desconocida. (fig. 4) (Monteiro et al., 2010; Montor, 2013). El dominio A o TIM barril formado de un pliegue muy simétrico de ocho hebras  $\beta$  paralelas dispuestas en un barril rodeado por ocho  $\alpha$  – hélices; el dominio A contiene cuatro regiones altamente conservadas y estrechamente relacionadas al sitio activo en todas las  $\alpha$ -amilasas (Bautista, 1997; Kuriki et al., 2005; Prakash & Jaiswal, 2010.; Prasana et al., 2013; Van der Maarel et al., 2002). La primera región abarca el fin del C-terminal de la hoja  $\beta_3$  y un residuo de histidina que interactúa con los residuos de glucosa del sustrato, la segunda región contiene la hoja  $\beta_4$  con un residuo de ácido aspártico, que actúa como nucleófilo durante la catálisis, la tercer región comprende la hoja  $\beta_5$  y un residuo de ácido glutámico que actúa como el donador/aceptor de protones, la cuarta región consiste en una hoja  $\beta_7$ , un residuo de histidina y un residuo de ácido

aspártico que pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos de glucosa del sustrato (Prakash & Jaiswal, 2010; Sivaramakrishnan et al., 2006). El dominio B está formado por un saliente entre la tercera hebra  $\beta$  y la tercera hélice  $\alpha$  del barril TIM. Tiene una muy irregular estructura rica en hojas  $\beta$  y varía considerablemente en tamaño y estructura entre las  $\alpha$ -amilasas. Dominio B forma una gran parte del sustrato uniendo hendiduras y se presume que es importante para las diferencias de especificidad de sustrato observadas entre  $\alpha$ -amilasas (Bautista, 1997; Prakash & Jaiswal, 2010). El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se encuentra entre los dominios A y B y puede actuar en la estabilización de la estructura de tres dimensional y activador como alostérico. (Bautista, 1997; Monteiro et al., 2010; Prakash & Jaiswal, 2010; Prasana et al., 2013), aunque otras suelen estabilizarse con  $\text{Na}^+$  (Nonaka et al., 2003) u otros iones. El dominio C constituye la parte C-terminal de la secuencia y es un dominio de ocho estructuras de lámina  $\beta$  en

sándwich antiparalelo que contiene un motivo de llave griega. Ambos dominios B y C se encuentran más o menos en los lados opuestos de la barril TIM (Prakash & Jaiswal, 2010).



**Figura 4:** Estructura 3D de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus* sp. dependiente del ión sodio (Na I, II y III). Se observan en azul el dominio A, en rojo el dominio B y en verde el dominio C (Nonaka et al., 2003).

Las  $\alpha$ -amilasas producidas por microorganismos más intensamente estudiadas con sus estructuras de tres dimensiones (3D) son: *Alteromonas haloplanctis* (AHA), de páncreas de cerdo (PPA), de *Aspergillus oryzae* (TAKA), *B. subtilis* (BSUA), *B. amyloliquefaciens* (BAA), *B. licheniformis* (BLA), *Pyrococcus woesei* / *furiosus* (PWA / PFA). Las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* son más termoestables y requieren una temperatura más alta y un tiempo más largo para la inactivación. Con pocas excepciones, todas las  $\alpha$ -amilasas conocidas contienen un ion de calcio conservada, que se encuentra en la interfaz entre los dominios A y B, y que se sabe que es esencial para tener una estable enzima activa. Las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* contienen tres o cuatro iones de calcio y uno ion de sodio y un puente de la tríada de metal calcio - sodio - calcio entre los dominios A y B, esta tríada de metal ha sido considerado como importante para mantener la estructura de la proteína en la

conformación correcta y para resistir la inactivación térmica de la enzima (Prakash & Jaiswal, 2010).

El mecanismo catalítico generalmente aceptado de la familia  $\alpha$ -amilasa es la de doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$ . El mecanismo consiste en dos residuos catalíticos en el sitio activo; un ácido glutámico como catalizador ácido / base y un aspartato como el nucleófilo (fig. 5) (Van der Maarel et al., 2002; Prakash & Jaiswal, 2010). Se trata de cinco pasos: (I) después de que el sustrato se ha unido en el sitio activo, el ácido glutámico en la forma de ácido dona un protón al oxígeno del enlace glicosídico, es decir, el oxígeno entre dos moléculas de glucosa en los subsitios - 1 y + 1 y el aspartato nucleófililico ataca el C1 de la glucosa en subsitio - 1; (II) se forma un estado de transición de iones como oxocarbonium seguido por la formación de un covalente intermedio; (III) la molécula protonada de glucosa en el subsitio +1 deja el sitio activo

mientras que una molécula de agua o de una nueva molécula de glucosa se mueve en el sitio activo y ataca el enlace covalente entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato; (IV) estado de transición de iones como oxocarbonium se forma de nuevo; (V) el glutamato como catalizador básico acepta un hidrógeno a partir de un agua de entrada o la recientemente entrada de molécula de glucosa en el subsitio +1, el oxígeno del agua de entrada o recientemente entrada de molécula de glucosa en subsitio +1 reemplaza la unión oxocarbonium entre la molécula de glucosa en subsitio -1 y la formación del aspartato a un nuevo grupo hidroxilo en la posición C1 de la glucosa en subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glicosídico entre la glucosa en subsitio -1 y +1 (transglicosilación). En el mecanismo de desplazamiento doble anteriormente mencionado tal como se propone por Koshland (1953), sólo dos de los tres residuos catalíticos conservados juega directamente un papel. El tercer residuo

conservado, es un segundo Aspartato, se une a los  $\text{OH}^{-2}$  y  $\text{OH}^{-3}$  de los grupos de sustrato a través de enlaces de hidrógeno y juega un papel importante en la distorsión del sustrato. Otros residuos de aminoácidos conservados pueden ser histidina, arginina y tirosina. Juegan un papel en el posicionamiento del sustrato en la correcta orientación dentro del sitio activo, la orientación correcta del nucleófilo, el estado de transición de estabilización, y la polarización de la estructura electrónica del sustrato. Además de las cuatro regiones de secuencia de aminoácidos conservadas, una quinta adiciona la región conservada puede ser identificado en miembros de la familia  $\alpha$ -amilasa. Esta región también contiene un Aspartato que actúa como ligando de calcio (Van der Maarel et al., 2002).

## **Producción**

La producción comercial de  $\alpha$ -amilasas se lleva a cabo en varias etapas, esencialmente debido a que los factores ambientales necesarios para el crecimiento óptimo del microorganismo que se emplea para la producción pueden diferir de los requeridos para la producción de enzimas. Estos parámetros incluyen la suplementación de nutrientes, pH del medio, relación osmótica, grado de aireación, la temperatura y el control de la contaminación durante la fermentación. El mantenimiento de la pureza del medio es también un factor muy importante, especialmente cuando la fermentación se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas. Aunque los detalles de los procesos de fermentación específicos adoptados por los diferentes fabricantes varían, quedan dos métodos principales para la producción de  $\alpha$ -amilasa, fermentación sumergida (SMF) y de estado sólido de fermentación (SSF) (Couto & Sanromán, 2006;

Naidu & Saranraj, 2013; Pandey et al., 2000). La producción de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus* por fermentación sumergida (SMF) y la fermentación de estado sólido (SSF) se ha investigado y dependerá de una variedad de factores fisicoquímicos (Monteiro et al., 2010; Pandey et al., 2000). SMF se ha utilizado tradicionalmente para la producción de enzimas industrialmente importantes debido a la facilidad de control de diferentes parámetros tales como pH, temperatura, aireación y transferencia de oxígeno y de humedad (Monteiro et al., 2010). Sistemas SSF parecen prometedores debido al potencial natural y las ventajas que ofrecen. SSF se parece el hábitat natural de los microorganismos y, por lo tanto, la opción preferida para los microorganismos para crecer y producir productos de valor añadido útil (Monteiro et al., 2010; Pandey et al., 2000). Por otro lado SMF puede ser considerado como una violación de su hábitat natural, en especial de los hongos (Singhania et al., 2009). Hongos y

levaduras se denominan como microorganismos adecuados para SSF de acuerdo con el concepto teórico de la actividad del agua, mientras que las bacterias han sido consideradas inadecuadas en este medio. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que los cultivos bacterianos pueden ser bien manejados y manipulados por los procesos SSF (Pandey, 2003). Hay otras ventajas de SSF más que SmF , incluyendo una productividad superior , la técnica más simple , menor inversión de capital , requisitos de energía más bajos y una menor producción de agua , una mejor recuperación del producto y la falta de formación de espuma , además de que se informó de que el proceso más adecuado para el desarrollo países. Recientemente, las investigaciones evaluaron si SSF es el mejor sistema para la producción de enzimas. Ellos encontraron que la SSF es apropiada para la producción de enzimas y otros productos termolábiles, especialmente cuando los rendimientos más altos se pueden

obtener en comparación con SMF (Couto & Sanromán, 2006; Tanyildizi, 2007).

Salva y Moraes (1995) estudiaron los efectos de diferentes fuentes de carbono en la producción de  $\alpha$  -amilasa. Mientras que el almidón de lactosa, dextrano y almidón soluble se encontraron adecuado para la producción de la enzima, se obtuvo el mayor rendimiento de la enzima cuando se utilizó glucosa. Syu y Chen (1997), también se investigaron los efectos de las diferentes fuentes de carbono (glucosa, maltosa, xilosa y almidón) sobre la producción  $\alpha$  -amilasa. Una mayor densidad celular y la tasa de crecimiento específico más alto se obtuvieron a partir de la glucosa, pero la mayor actividad de la enzima y la actividad enzimática específica más alta se obtuvieron a partir de almidón.

En fermentaciones sumergidas y aireadas de *B. licheniformis* en régimen discontinuo se ha

demostrado que la utilización de glucosa como sustrato en lugar de almidón, aumenta la producción de  $\alpha$ -amilasa. Paralelamente, la viscosidad del caldo de cultivo se reduce y desaparece el problema de la esterilización del almidón, causa frecuente de contaminación del medio durante las primeras horas del proceso (Tonkova et al., 1993).

La producción de  $\alpha$ -amilasa se encuentra reprimida por glucosa e inducida por los fragmentos procedentes de la degradación del almidón. En la fermentación de *B. licheniformis* los mayores rendimientos en  $\alpha$ -amilasa se obtienen utilizando glucógeno y maltotetraosa, mostrándose también eficaz con maltotriosa y maltopentosa. Sin embargo, con disacáridos como la maltosa el rendimiento se reduce al 20 % del obtenido con glucógeno, no siendo significativa la producción de  $\alpha$ -amilasa mediante la utilización de diversos monosacáridos (Saito & Yamamoto, 1975).

Las diferentes  $\alpha$ -amilasa procedentes de distintas especies generan una amplia variedad de distribuciones de oligosacáridos como productos finales de la hidrólisis del almidón. La  $\alpha$ -amilasa procedente de *Bacillus amyloliquefaciens* produce maltohexosa como componente mayoritario mientras el *Bacillus licheniformis* da, principalmente, maltopentosa y maltosa. La glucosa es obtenida solamente como producto minoritario (Norman, 1981).

La técnica de inmovilización de células también se ha empleado para la producción de  $\alpha$  – amilasa. Células de membrana inmovilizados de *B. licheniformis* produjeron 176 % más de la enzima que las células libres (Pandey et al., 2000).

## **Propiedades fisicoquímicas**

Las propiedades fisicoquímicas de las diferentes  $\alpha$ -amilasas varían en un amplio intervalo dependiendo del organismo productor, indicando una importante adaptación evolutiva a las condiciones medioambientales (Bautista, 1997).

Entre los parámetros físicos, el pH del medio de crecimiento desempeña un papel importante mediante la inducción de cambios morfológicos en el organismo y en la secreción de enzimas. El cambio de pH observado durante el crecimiento del organismo también afecta a la estabilidad del producto en el medio. La mayoría de las cepas de *Bacillus* utilizados comercialmente para la producción de  $\alpha$ -amilasa bacteriana por SMF tienen un pH óptimo entre 6,0 y 7,0 para el crecimiento y la producción de enzimas. Esto también es cierto de las cepas utilizadas en la producción de la enzima por la SSF. En la mayoría de los casos no

se especifica el pH utilizado excepción de pH 4,2 en el caso de *Aspergillus oryzae*, 8,0 en *Aspergillus oryzae* y 6,8 para *Bacillus amyloliquefaciens* (Rani et al., 2003). El pH óptimo para la actividad de las distintas  $\alpha$ -amilasas oscila entre, aproximadamente, 2 y 10,5. Para la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas producidas por microorganismos de la especie *Aspergillus*, este intervalo se limita a 4,5-6,6. Algunas procedentes de *Bacillus* fuertemente acidófilos, pueden encontrar su pH óptimo a valores alrededor de 2 y de otros alcalófilos a valores de pH iguales o superiores a 10, aunque para la mayor parte de las  $\alpha$ -amilasas procedentes de bacterias el intervalo óptimo se encuentra entre 4,5 y 6,5 (Bautista, 1997).

La influencia de la temperatura sobre la producción de la amilasa está relacionada con el crecimiento del organismo. La temperatura de actividad óptima de la  $\alpha$ -amilasa producida por el

hongo filamentoso *A. oryzae* varía entre 35 y 55 °C, en función de la cepa que lo produce (Bautista, 1997; Naidu & Saranraj, 2013). La actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasa procedente de bacterias del genero *Bacillus* es óptima, generalmente, a valores más altos de temperatura, llegando hasta los 100 °C en algunas cepas de *B. licheniformis* (Naidu & Saranraj, 2013).

En general, la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas son estables en los intervalos fisiológicos habituales de temperatura y pH. La estabilidad de las enzimas no solo depende de las condiciones de pH y temperatura sino, también, de la composición del medio en el que se encuentren. El intervalo de pH en el que las enzimas son estables, se modifica en función de la temperatura y el tiempo de incubación en unas condiciones determinadas. En general, puede hablarse de una mayor termoestabilidad de las  $\alpha$ -amilasas procedentes de *Bacillus* (Bautista, 1997).

La  $\alpha$  - amilasa es una enzima inducible y generalmente se induce en presencia de almidón o su producto de hidrólisis, la maltosa. La mayoría de los informes disponibles en la inducción de la  $\alpha$  - amilasa en diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* sugieren que la molécula inductora general es la maltosa, pero en fermentaciones sumergidas y aireadas de *B. licheniformis* en régimen discontinuo se ha demostrado que la utilización de glucosa como sustrato en lugar de almidón, aumenta la producción de  $\alpha$ -amilasa. Paralelamente, la viscosidad del caldo de cultivo se reduce y desaparece el problema de la esterilización del almidón, causa frecuente de contaminación del medio durante las primeras horas del proceso (Naidu & Saranraj, 2013; Tonkova et al., 1993).

Las fuentes de nitrógeno orgánico se han preferido para la producción de  $\alpha$  - amilasa. El extracto de levadura se ha utilizado en la

producción de  $\alpha$ -amilasa a partir de *Streptomyces* sp. , *Bacillus* sp. y *Halomonas meridiano*. Fuentes de nitrógeno orgánico se han preferido para la producción de  $\alpha$  - amilasa.

El fosfato juega un importante papel regulador en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios en microorganismos y del mismo modo que afecta el crecimiento del organismo y la producción de  $\alpha$ -amilasa. En *Bacillus amyloliquefaciens* donde los bajos niveles de fosfato dieron lugar severamente baja densidad celular y sin producción de  $\alpha$ -amilasa. En contraste, las concentraciones elevadas de fosfato eran inhibitoras de la producción de enzimas por *Bacillus amyloliquefaciens* (Rani et al., 2003).

En cuanto al papel de otros iones en cuanto al  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Cl^+$ ,  $SO_4^{2+}$  no tenían ningún efecto, mientras que el  $Ca^{2+}$  era inhibitora para la producción de amilasa por *Aspergillus*

*oryzae*.  $Mg^{2+}$  juega un papel importante y la producción se redujo a 50 % cuando el  $Mg^{2+}$  fue omitido en el medio. El  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  muestran la estimulación coordinada de la producción de enzimas por *Bacillus* sp. (Naidu & Saranraj, 2013).

#### 1.5.2.2 $\beta$ -amilasas

A diferencia de otros miembros de la familia de la amilasa, sólo se han hecho algunos intentos para estudiar  $\beta$ -amilasas de origen microbiano, como  $\beta$ -amilasas generalmente se han obtenido a partir de fuentes vegetales. Las cepas bacterianas que pertenecen a *Bacillus*, *Pseudomonas* (aeróbica) y *Clostridium* sp. (anaeróbico), cepas de actinomicetos pertenecientes a *Streptomyces* sp. y cepas de hongos que pertenecen a *Rhizopus* sp. se han informado que sintetizan  $\beta$ -amilasa (Pandey et al., 2000).

Las  $\beta$ -amilasas (EC 3.2.1.2) son enzimas intra y extracelulares clasificadas como exoenzimas debido a que hidrolizan los penúltimos enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) del extremo no reductor del almidón o de sustratos análogos para producir  $\beta$ -maltosas y  $\beta$ -dextrinas límite, estas últimas se forman porque las  $\beta$ -amilasas son incapaces de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -(1,6) (Vihinen & Mantsala, 1989).

Los metales bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  aumentan significativamente la actividad de las  $\beta$ -amilasas (Montor, 2013). El peso molecular de las  $\beta$ -amilasas varía entre 31,6 y 160 kDa (Vihinen & Mantsala, 1989).

La estructura del sitio catalítico de las  $\beta$ -amilasas, al igual que las  $\alpha$ -amilasas, consiste en un TIM barrel ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, seguido por el “loop” de la región C-terminal, que aunque puede conferir estabilidad a toda la molécula de la  $\beta$ -amilasa, no está involucrado

en la catálisis. El TIM barrel de las  $\beta$ -amilasas, es más similar al TIM barrel de las triosa fosfato isomerasas, que al TIM barrel de las  $\alpha$ -amilasas (Mikami, 2000).

### 1.5.2.3 Glucan $\alpha$ (1-4) glucosidasas

Las glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas (EC 3.2.1.3) hidrolizan enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) ubicados en los extremos no reductores del almidón, glucógeno, dextrina y maltosa, además hidrolizan también enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-3), aunque más lentamente (Latorre, 2008). Las glucoamilasa se puede derivar de un número de fuentes, tales como plantas, animales y microorganismos (Pandey et al., 2000). Las glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas de hongos son extracelulares, siendo estos los principales productores. En contraste, las glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas solo son producidas por unas cuantas bacterias, por ejemplo: *B. stearothermophilus*, *Clostridium*

*thermohydrosulfuricum* y *Hulobacterium sodomense*, en las cuales la enzima suele estar unida a la membrana celular (Montor, 2013).

Las glucan  $\alpha$ -(1-4)-glucosidasas adoptan un dominio catalítico helicoidal que consiste de doce  $\alpha$  hélices, de las cuales seis forman un centro interno que se encuentra conectado a través de seis  $\alpha$  hélices periféricas que son paralelas cada una de la otra pero antiparalelas a las  $\alpha$  hélices del centro interno. Esta estructura se conoce como barril de plegamiento ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> y no es tan frecuente como el plegamiento TIM barrel (Pujadas & Palau, 1999).

#### **1.5.2.4 Isoamilasas**

Las isoamilasas (EC 3.2.1.68) son enzimas que pueden ser intra o extracelulares y en algunos casos pueden estar unidas a la membrana celular, como la isoamilasa de *Sacharomyces cerevisiae* (Montor, 2013). Las isoamilasas han sido

encontradas en solo unas cuantas cepas bacterianas. Hidrolizan enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) de amilopectinas, glucógeno, varias dextrinas y oligosacáridos, sin embargo, no pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) de pululano, que son  $\alpha$ -glucanos lineales que consisten en unidades de maltotriosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6), ni todos los enlaces  $\alpha$ -(1-6) de  $\beta$ -dextrinas límite, probablemente por su baja afinidad a la cadena lateral acortada. Son usadas generalmente para producir glucosa, maltosa, maltitol, trehalosa y ciclodextrinas (Vihinen & Mantsala, 1989).

La estructura de las isoamilasas del género *Pseudomonas* consiste en un pseudo TIM barrel ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> ya que, en comparación con el TIM barrel de otras amilasas, carece de una  $\alpha$  hélice entre la quinta y sexta hoja  $\beta$ . Cuentan también con dos estructuras que no están presentes en el resto de las amilasas, la primera es un “loop” que está presente entre la tercer hoja  $\beta$  y la tercer  $\alpha$  hélice, y se ubica

en el dominio B, pero no puede considerarse como un dominio independiente porque forma un “cluster” globular junto con el “loop” que se ubica entre la cuarta hoja  $\beta$  y la cuarta  $\alpha$  hélice, la segunda estructura es un dominio extra al que se le ha llamado dominio N y que se ubica en la región N-terminal. Las isoamilasas solo tienen un  $\text{Ca}^{2+}$  ligado y no se encuentra en la misma posición conservada que se ha reportado para otras amilasas (Montor, 2013).

#### **1.5.2.5 Pululanasa**

Las pululanasa (EC 3.2.1.41) son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) o  $\alpha$ -(1-4) del pululano y otros oligosacáridos ramificados, por lo que se han clasificado, de acuerdo a la especificidad de reconocimiento de dichos enlaces glucosídicos, en pululanasa tipo I y tipo II. Las pululanasa tipo I son las más ampliamente

estudiadas, tienen la capacidad de hidrolizar eficientemente los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) del pululano y polisacáridos ramificados. Las pululanasas tipo II, también llamadas amilopululanasas, son importantes en la industria de procesamiento de almidón debido a su capacidad de hidrolizar enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) y  $\alpha$ -(1-4) (Montor, 2013). Su actividad fue observada por primera vez en *Enterobacter aerogenes* (Vihinen & Mantsala, 1989).

### 1.5.3 Almidón

Las plantas sintetizan almidón como resultado de la fotosíntesis, el proceso durante el cual la energía de la luz solar se convierte en energía química. El almidón se sintetiza en los plástidos encontrados en las hojas como un compuesto de almacenamiento para la respiración durante los períodos de oscuridad. También se sintetiza en amiloplastos encontrados en tubérculos, semillas, raíces y como un compuesto de almacenamiento a largo plazo

(Steffolani, 2010; Vargas & Silver, 2002). En estos últimos orgánulos, grandes cantidades de almidón se acumulan en forma de gránulos insolubles en agua. La forma y el diámetro de estos gránulos dependen del origen botánico. Para las fuentes de almidón comercialmente interesantes, los tamaños de los gránulos se extienden de 2 -30 (almidón de maíz) 5 - 100  $\mu\text{m}$  (almidón de papa) (Martinez, 2005; Van der Maarel et al., 2002).

El almidón es un constituyente importante de la dieta humana y, para este fin, se utiliza química y enzimáticamente transformada en una variedad de diferentes productos, tales como hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa, fructosa, maltodextrina o derivados de ciclodextrinas, utilizados en la industria alimentaria (Martinez, 2005; Monteiro et al., 2010). Además de eso, los azúcares producidos se pueden fermentar para producir etanol. A pesar de la gran cantidad de plantas capaces de producir almidón, sólo unas pocas plantas son importantes para el procesamiento de almidón industrial. Las principales fuentes industriales son el maíz, la tapioca, la papa y el trigo, pero las limitaciones tales como la resistencia

térmica, la descomposición térmica y alta tendencia a la retrogradación limitan su uso en algunas aplicaciones industriales de alimentos (Monteiro et al., 2010).

El almidón es un polímero de la glucosa ligada a otra a través del enlace glicosídico. Este enlace glicosídico es estable a un pH alto, pero hidroliza a pH bajo. Al final de la cadena polimérica, un grupo aldehído latente está presente. Este grupo se conoce como el extremo reductor. Dos tipos de polímeros de glucosa están presentes en almidón: (i) de amilosa y (ii) de amilopectina (Beltran & Herreño, 2010; Martinez, 2005; Steffolani, 2010; Van der Maarel et al., 2002; Vargas & Silver, 2002). El contenido en amilosa varía según la fuente de origen y suele estar comprendido entre el 17 y el 35 % en peso. La Tabla 6 recoge la composición de diversos almidones (Martinez, 2005).

**Tabla 6:** Porcentaje de amilosa y amilopectina de almidones de diferente origen.

<b>Fuente</b>	<b>% Amilosa</b>	<b>% Amilopectina</b>
<b>Trigo</b>	26	74
<b>Cebada</b>	22	78
<b>Maíz</b>	28	72
<b>Amilomaíz</b>	51-65	49-35
<b>Maíz céreo</b>	1	99
<b>Avena</b>	27	73
<b>Arroz</b>	18	82
<b>Arroz céreo</b>	1	99
<b>Mijo</b>	25	75
<b>Mijo céreo</b>	1	99
<b>Patata</b>	23	77
<b>Alubia</b>	24	76
<b>Guisante</b>	35	

Fuente: Martinez, 2005

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, debido a la fuerza de cohesión de los puentes de hidrógeno, que mantienen unidas las cadenas pero, a medida que la temperatura se eleva hasta lo que se conoce como

temperatura inicial de gelatinización, comienzan a absorber agua. La gelatinización corresponde a los fenómenos de hinchamiento irreversible y solubilización observados cuando los granos de almidón se calientan a temperaturas superiores a 60 °C en presencia de exceso de agua. Las temperaturas iniciales de gelatinización son características de cada tipo concreto de almidón, pero generalmente se hallan en el intervalo 55-70 °C. A medida que los granos absorben agua se produce una pérdida progresiva de la birrefringencia y de su cristalinidad. La solubilización del almidón conduce a la destrucción parcial de la estructura granular dependiendo de la especie botánica y del tipo cristalino del almidón nativo. Conforme prosigue el hinchamiento aumenta espectacularmente la viscosidad de la suspensión-disolución; las moléculas de amilosa son lixiviadas de los granos hinchados y contribuyen también a la viscosidad. Si se sigue calentando mientras se agita, la viscosidad comienza pronto a decaer a medida que los granos pierden su integridad. Si se deja que la pasta se enfríe, la viscosidad vuelve a elevarse, a medida que las uniones a través de puentes de hidrógeno entre la amilopectina y la amilosa se

restablecen para dar un producto de consistencia tipo gel (Martinez, 2005; Vargas & Silver, 2002).

Los geles obtenidos tienen estructuras tridimensionales y porosas. Esquemáticamente estos geles se forman a partir de una matriz continua de uno de los polímeros que retienen pequeñas gotas del otro polímero. La composición de cada una de las dos fases depende principalmente del grado de gelatinización (parcial/total) y de la relación amilosa/amilopectina en el grano de almidón. Resumiendo, las características del gel de almidón dependen, entre otros factores, del tamaño, de la estructura morfológica de los granos, de la relación amilosa/amilopectina, de la temperatura y del tiempo de cocción. Debido a los cambios morfológicos que se producen durante la gelatinización del almidón, éste adquiere una estructura más asequible al ataque enzimático (Martinez, 2005).

Cuando se dejan en reposo durante unas horas, las disoluciones de almidón o las pastas de esta sustancia, comienzan a mostrar cambios en sus propiedades reológicas;

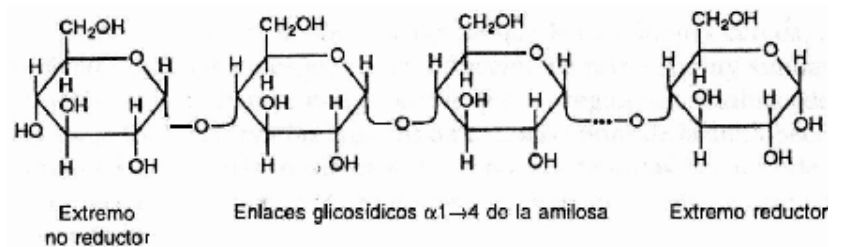
las disoluciones diluidas pierden viscosidad pero las pastas concentradas y los geles se tornan gomosos y exudan agua. Los dos tipos de cambios señalados se deben al fenómeno denominado retrogradación, que afecta a las moléculas de amilosa. Éstas en el transcurso del tiempo se asocian y cristalizan, La tendencia a la retrogradación se ve incrementada por las bajas temperaturas, especialmente alrededor de los 0 °C, el pH neutro, las altas concentraciones de almidón y la ausencia de tensioactivos. También depende del peso molecular y del tipo de almidón (Martinez, 2005; Vargas & Silver, 2002).

El fenómeno de recristalización de la amilosa en la retrogradación dificulta la hidrólisis enzimática del almidón por las amilasas (Martinez, 2005).

### **1.5.3.1 Amilosa**

La amilosa es un polímero lineal formado de hasta 6000 unidades de glucosa unidas por enlaces

$\alpha$  (1-4) (fig. 5) (Beltrán & Herreño, 2010; Martínez, 2005; Monteiro et al., 2010; Steffolani, 2010; Van der Maarel et al., 2002; Vargas & Silver, 2002). Debido a su carácter prácticamente lineal y a la presencia casi exclusiva de los enlaces  $\alpha$ (1-4), es susceptible de complejar moléculas hidrófobas (yodo, ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas); su capacidad de fijación de yodo es del orden de 20 mg por 100 mg de amilosa. Esta propiedad se debe a la conformación en hélice de esta macromolécula, en la cual todos los grupos hidrófilos están orientados hacia el exterior mientras que los grupos hidrófobos lo están hacia el interior. Esta capacidad de fijación del yodo es la base la cuantificación analítica del almidón, de la caracterización de la amilosa y de la determinación de su proporción en el almidón en relación a la amilopectina (Martínez, 2005).



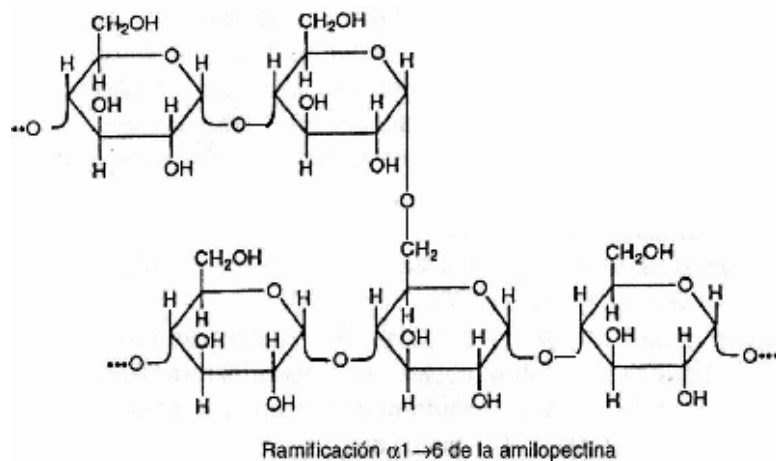
**Figura 5:** Amilosa (Martinez, 2005).

El tamaño molecular de la amilosa es muy variable; así en los cereales presenta un grado de polimerización entre 1000 y 2000, mientras que en la patata puede alcanzar los 4500 (Martinez, 2005; Van der Maarel et al., 2002). Ello determina pesos moleculares comprendidos entre 150,000 y 750,000 Dalton (Martinez, 2005).

### 1.5.3.2 Amilopectina

La amilopectina es el polímero mayoritario del almidón, ya que supone entre el 70 y el 80 % en peso (Beltrán & Herreño, 2010; Martinez, 2005). Se trata de una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa pueden ser de 10 a 60 unidades de glucosa con enlace α(1-4) cuando

forman parte de cadenas lineales y de 15 a 45 unidades de glucosa con enlaces  $\alpha(1-6)$  cuando actúan como nexo de unión entre dos cadenas para formar ramificaciones (fig. 6) (Martinez, 2005; Monteiro et al., 2010; Steffolani, 2010; Van der Maarel et al., 2002; Vargas & Silver, 2002) . El grado de polimerización es aproximadamente de  $10^6$  unidades de glucosa, oscilando su peso molecular en el intervalo comprendido entre  $10^6-10^7$  Dalton (Martinez, 2005; Van der Maarel et al., 2002).



**Figura 6:** Amilopectina (Martinez, 2005).

Alrededor del 4-5 % de las unidades de glucosa están implicadas en los enlaces  $\alpha(1-6)$  (Martinez, 2005; Van der Maarel et al., 2002).

#### **1.5.4 Aplicaciones industriales de las amilasas**

Hoy en día la amilasa casi ha sustituido la hidrólisis química del almidón en la industria de procesamiento de almidón. Las amilasas se encuentran entre las enzimas más importantes y son de gran importancia para la biotecnología, que constituyen una clase de enzimas industriales que tienen aproximadamente el 25 % del mercado mundial de la enzima. Las amilasas obtenidas de microorganismos tienen un amplio espectro de usos industriales, ya que son más estables que las amilasas de plantas y animales. La principal ventaja de la utilización de microorganismos para la producción de amilasas es la mayor capacidad de producción económica, y también microbios son fáciles de manipular para obtener enzimas de la naturaleza deseada. Enzimas amilolíticas que degrada almidón son de gran importancia en el sector biotecnológico que van desde alimentos, la fermentación, textil para industrias de papel (Pandey et al., 2000). Aunque amilasas pueden ser obtenidos de varias fuentes, como las plantas y los animales, las enzimas de origen microbiano, generalmente satisfacen las demandas industriales y habían

hecho una contribución significativa a los alimentos y la industria de bebidas en las últimas tres décadas (Gurung et al., 2013). Debido al amplio intervalo de operación (temperatura y pH) de las amilasas microbianas, estas son altamente demandadas por la industria del almidón (Montor, 2013). Las  $\alpha$ -amilasas son una de la forma más popular e importante de amilasas industriales (Monteiro et al., 2010). Las  $\alpha$ -amilasas tienen aplicación potencial en una amplia serie de procesos industriales tales como las industrias de alimentos, de fermentación, textiles, papel, detergente, y farmacéuticas. Sin embargo también tienen aplicación de la amilasa se ha expandido en muchos campos como la química clínica, medicinales y analítica (Gurung et al., 2013).

### **Conversión del almidón**

Las aplicaciones más extendidas de  $\alpha$ -amilasas se encuentran en la industria del almidón, que se utilizan para la hidrólisis del almidón en el proceso de licuefacción de almidón que convierte el almidón en jarabes de fructosa y glucosa, el

cual un proceso biotecnológico en el que es necesario el uso consecutivo de varias enzimas (Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002; Monteiro et al., 2010). La conversión enzimática de todo el almidón incluye: la gelatinización, que implica la disolución de los gránulos de almidón, formando de ese modo una suspensión viscosa; licuefacción, que implica la hidrólisis parcial y la pérdida de la viscosidad; y la sacarificación, que implica la producción de glucosa y maltosa a través de la hidrólisis adicional (Gupta et al., 2003; Gurung et al., 2013; Prakash & Jaiswal, 2010). Inicialmente, se utilizó la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* pero ha sido reemplazado por el  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus licheniformis* (Van der Maarel et al., 2002). Las enzimas de las especies de *Bacillus* son de interés especial para procesos biotecnológicos a gran escala debido a su notable estabilidad térmica y porque los sistemas de expresión eficaces están disponibles para estas enzimas (Prakash & Jaiswal, 2010).

## **Industria de los detergentes**

Industrias de detergentes son los principales consumidores de enzimas, tanto en términos de volumen y valor. El uso de enzimas en formulaciones detergentes mejora la capacidad de los detergentes para eliminar manchas difíciles y hacer que el detergente sea ambientalmente seguro. Las amilasas son el segundo tipo de enzimas utilizadas en la formulación de detergente enzimática, y el 90 % de todos los detergentes líquidos contienen estas enzimas (Gupta et al., 2003; Gurung et al., 2013; Kirk et al., 2002; Monteiro et al., 2010). Estas enzimas se utilizan en los detergentes para lavar la ropa y para lavavajillas automáticos para degradar los residuos de los alimentos con almidón, como las patatas, salsas, natillas, chocolate, etc en dextrinas y otros oligosacáridos más pequeños (Gurung et al., 2013; Monteiro et al., 2010). Las amilasas tienen actividad a temperaturas más bajas y pH alcalino, el mantenimiento de la estabilidad necesaria en condiciones de detergente y la estabilidad a la oxidación de las amilasas es uno de los criterios más importantes para su uso en detergentes en los

cuales el medio ambiente de lavado es muy oxidante (Kirk et al., 2002). La eliminación del almidón de superficies también es importante para proporcionar un beneficio de blancura, ya que el almidón puede ser un atrayente para muchos tipos de suciedad en partículas. Ejemplos de amilasas utilizadas en la industria de los detergentes se derivan de *Bacillus* o *Aspergillus* (Monteiro et al., 2010).

### **Producción de alcohol combustible**

El etanol es el biocombustible líquido más utilizado. Para la producción de etanol, como materia prima está el maíz, patatas y trigo, el almidón es el sustrato más utilizado debido a su bajo precio y la materia prima fácilmente disponible en la mayoría de las regiones del mundo (Bautista, 1997; Chi et al., 2009). En esta producción, el almidón tiene que ser solubilizado y luego sometido a dos pasos enzimáticos con el fin de obtener azúcares fermentables. La bioconversión de almidón en etanol implica la licuefacción y sacarificación, donde el almidón se convierte en azúcar usando un microorganismo amilolítica o enzimas tales como amilasa,

seguido por fermentación, donde el azúcar se convierte en etanol utilizando un microorganismo de fermentación de etanol, tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Monteiro et al., 2010). Con el fin de obtener una nueva cepa de levadura que puede producir etanol a partir de almidón directamente sin la necesidad de un proceso de sacarificación por separado, se realizó la fusión de protoplastos entre la levadura *Saccharomyces fibuligera* amilolíticas y *S. cerevisiae* (Chi et al., 2009). Entre las bacterias, la  $\alpha$ -amilasa obtenida a partir de bacterias termorresistentes como *Bacillus licheniformis* o de ingeniería cepas de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* se utiliza durante la primera etapa de la hidrólisis de suspensiones de almidón (Monteiro et al., 2010).

### **Industria de alimentos**

Las amilasas se utilizan ampliamente en la industria de alimentos procesados, como pasteles, cervezas, elaboración de productos para facilitar la digestión, zumos de frutas y jarabes de almidón (Couto & Sanromán, 2006; Gurung et al., 2013). Las  $\alpha$ -amilasas han sido ampliamente utilizados en la

industria de la panificación. Estas enzimas se pueden añadir a la masa de pan para degradar el almidón en la harina en dextrinas más pequeñas, que son posteriormente fermentadas por la levadura. La adición de  $\alpha$ -amilasa para los resultados de masa en la mejora de la tasa de fermentación y la reducción de la viscosidad de la masa, que resulta en mejoras en el volumen y la textura del producto (Gurung et al., 2013). Por otra parte, genera azúcar adicional en la masa, lo que mejora el sabor, color de la corteza y el tostado de las cualidades del pan. Además de generar compuestos fermentables, las  $\alpha$ -amilasas también tienen un efecto antienviejamiento en la cocción del pan, y que mejoran la retención de la suavidad de los productos horneados, el aumento de la vida útil de estos productos (Kirk et al., 2002; Gupta et al., 2003; Van der Maarel et al., 2002). Actualmente, una amilasa maltogénica termoestable de *Bacillus stearothermophilus* se utiliza comercialmente en la industria de panadería (Van der Maarel et al., 2002). Las amilasas se utilizan también para la clarificación de zumos de fruta o cerveza, o para el tratamiento previo de la alimentación

animal para mejorar la digestibilidad de la fibra (Monteiro et al., 2010; Van der Maarel et al., 2002).

### **Industria textil**

Las amilasas se utilizan en la industria textil para el proceso de desencolado. Los agentes de apresto como el almidón se aplican al hilo antes de la producción de la tela para asegurar un proceso de tejido rápido y seguro. El almidón está en un muy atractivo tamaño, porque es barato, fácilmente disponible en la mayoría de las regiones del mundo, y se puede quitar fácilmente. El almidón se retira después de la tela tejida en un proceso en húmedo en la industria de acabados textiles. Desencolado implica la eliminación del almidón de la tela que sirve como agente de refuerzo para evitar la rotura del hilo de urdimbre durante el proceso de tejido. Las amilasas eliminan selectivamente el tamaño y no atacan las fibras (Gupta et al., 2003; Gurung et al., 2013; Monteiro et al., 2010). Amilasas de *Bacillus* fue empleado en la industria textil desde hace mucho tiempo.

## **Industria del papel**

El uso de  $\alpha$ -amilasas en la industria de la pulpa y el papel es para la modificación de almidón de papel dotado de recubrimiento, es decir, para la producción de baja viscosidad, de almidón de alto peso molecular (Gupta et al., 2003; Gurung et al., 2013; Van der Maarel et al., 2002) . El tratamiento de recubrimiento sirve para hacer que la superficie de papel sea lo suficientemente suave y fuerte, para mejorar la calidad de la escritura del artículo. En esta aplicación, la viscosidad del almidón natural es demasiado alta para el apresto de papel y esto puede ser alterado por degradar parcialmente el polímero con  $\alpha$ -amilasas en un proceso por lotes o procesos continuos. El almidón es un buen agente de encolado para el acabado de papel, la mejora de la calidad y la facilidad de borrado, además de ser un buen recubrimiento para el papel. El tamaño mejora la rigidez y la resistencia en el papel (Gupta et al., 2003; Gurung et al., 2013).

## **Uso en Medicina**

Un alto de lo normal de concentración de amilasas puede predecir una de varias condiciones médicas, incluyendo la inflamación aguda del páncreas, úlcera péptica perforada, íleo estrangulamiento, la torsión de un quiste ovárico, macroamilasemia y paperas. En otros fluidos corporales también amilasa se puede medir, incluyendo orina y fluido peritoneal. En diversas partes del cuerpo humano fluidos de la actividad  $\alpha$ -amilasa nivel es de importancia clínica, por ejemplo, en la diabetes, pancreatitis, y la investigación del cáncer (Gurung et al., 2013).

### 1.5.5 *Bacillus licheniformis*

El género *Bacillus* un género clásico en Microbiología y uno de los más estudiados. Fue descrito por primera vez por en 1872 a partir de un aislado obtenido de materia orgánica del suelo. Estas bacterias se caracterizan por tener una forma alargada, que simula un bastón, y suelen ser móviles con flagelos peritricos. Más del 90 % de las especies de este género son catalasa positivo, formadoras de endoesporas durante la fase estacionaria, móviles y Gram positivo en cultivos frescos (Donohue & Bernlohr, 1978). Las especies pertenecientes al género *Bacillus* crecen bien en medios sintéticos que contengan azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y amoníaco como única fuente de nitrógeno. Muchos miembros de este género son productores de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan polisacáridos. La mayoría de las especies son mesófilas, con temperaturas óptimas que oscilan entre 30 y 45 °C, pero el género también incluye especies termófilas con una temperatura óptima superior a 65 °C (Todar, 2005).

La taxonomía de *Bacillus licheniformis*: Organismo celular; Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; grupo *Bacillus subtilis*; *Bacillus licheniformis*.

*B. licheniformis* es una bacteria como se dijo anteriormente formadora de esporas, Gram-positivas, ampliamente distribuido como un organismo saprófito que contribuye al ciclo de la materia dada la gran cantidad de enzimas que produce. A diferencia de la mayoría de los bacilos, que son predominantemente aeróbico, *B. licheniformis* es un anaerobio facultativo, lo que puede permitir que crezca en nichos ecológicos adicionales (Ageitos, 2011, Rey et al., 2004). Está considerado como un microorganismo seguro, dado que no se ha encontrado que produzca toxinas y, aunque puede crecer fácilmente en la piel humana, no se han encontrado evidencias de septicemias ni enfermedades causadas específicamente por este microorganismo. Por ello, ha sido reconocido como microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la “U.S. Food and Drug Administration” (Ageitos, 2011).

Existen numerosos usos comerciales y agrícolas para *B. licheniformis* y sus productos extracelulares. Este microorganismo produce gran cantidad de enzimas extracelulares de importancia industrial tales como proteasas,  $\alpha$ -amilasas, penicilinasas, pentosanasas, cicloglucosiltransferasa,  $\beta$ -mananasa y varias enzimas pectinolíticas. (Ageitos, 2011, Rey et al., 2004). En cuanto a las proteasas y la  $\alpha$ -amilasa se ha descrito que es capaz de secretar cantidades de proteína superiores a 25 g/L (Schallmey et al., 2004), lo que lo convierte en un microorganismo muy interesante para su estudio. Las proteasas producidas por *B. licheniformis* se utilizan principalmente para la industria de detergentes y en el encurtido de cuero (Rey et al., 2004). Las amilasas se utilizan para la hidrólisis del almidón. Ciertas cepas de *B. licheniformis* se utilizan para la producción de antibióticos péptidos, tales como la bacitracina y protricina. Estos microorganismos pueden ser aislados de suelos y restos vegetales, tienen la morfología típica del género *Bacillus*, son extremadamente móviles en observación de muestras frescas al microscopio (Ageitos, 2011, Rey et al., 2004).

Durante su crecimiento, *B. licheniformis* puede formar cadenas. Sus colonias en placa se vuelven opacas con superficie roma y áspera, y suelen tener una adhesión muy fuerte al agar (fig. 10). Es común la formación de excrecencias filiculares, y suele acumular lóbulos mucilaginosos cuando crecen en medios como glucosa agar, o agar glutamato-glicerol, debido a la producción de un glutamil polipéptido que da una forma amorfa a los bordes de la colonia. Este microorganismo produce extracelularmente un levano de sacarosa y rafinosa con interés prebiótico y puede crecer hasta una temperatura de 55 °C (Ageitos, 2011,), por otro lado han aislados muchas cepas de *Bacillus licheniformis* que son termófilas aisladas de aguas termales (Batrakov et al., 2003). Los cultivos antiguos tienen tendencia a volverse marrones, produciendo un producto extracelular mucilaginoso y un olor característico.



**Figura 7:** Aspecto típico de las colonias de *B. licheniformis* en medio Luria- Bertani Agar (Ageitos, 2011).

Se ha descrito que el porcentaje de C+G del DNA varía de 42 a 49 % y los estudios de hibridación DNA-DNA han demostrado que es una especie homogénea genéticamente. El genoma de la especie tipo *B. licheniformis* DSM13/ATCC1458 está organizado en un único cromosoma y tiene una longitud de 4,22 Mb con un contenido de GC del 46,2 %. En el año 2004 investigadores de Novozymes (Veith et al., 2004) y de la Universidad de Göttingen (Rey et al., 2004) secuenciaron el genoma de *B. licheniformis*

DSM 13 / ATCC 14580. Su genoma consta de 4 222,597-4 222,645 bp, con 4152-4196 secuencias codificantes de proteína, de las cuales 138 están anotadas como peptidasas (Rawlings et al., 2008).

#### **1.5.6 Géiseres de Calientes-Candarave**

La palabra géiser proviene del idioma Islandés, del verbo gjosa (brotar) que deriva en geisir. Se puede definir como una fuente termal intermitente en forma de surtidor (Olivera, 2013). Los géiseres son descargas de agua termal intermitentes en forma de surtidor, algunas veces de frecuencia regular de agua caliente y vapor saturado. Ocurre por una generación violenta de vapor en una cavidad subterránea relativamente confinada alimentada en superficie por agua fría y en la base por agua muy caliente. La expulsión se origina al aumentar la presión de vapor, que crea una descomposición y luego una ligera descarga inicial; posteriormente se reduce el elevado punto de ebullición de forma que el agua hierve y es expulsada a la superficie

acompañada de vapor de agua, vaciándose periódicamente la cavidad (Alfaro, 2002).

En el Perú también existe este raro fenómeno geológico; actualmente se conocen cuatro zonas: Baños de Churín (sierra de Lima), El Tubo en Pampa de los Chivatos (Zorritos, Tumbes), Fuente termo-minero-medicinal de San Cristobal - Putina (Moquegua) y Calientes en Candarave (Tacna) (Olivera, 2013).

Los géiseres de Calientes-Candarave se hallan en la sierra de Tacna, en la meseta del Collao a una altura de 4 400 m, se trata de un antiguo volcán sin cono cuyo cráter se ha llenado de agua a causa de los deshielos de la cordillera. Este lugar aparenta ser un conjunto de 85 géiseres porque en varios puntos aparecen afloramientos de agua con temperaturas que sobrepasan los 86 °C (186,2 °F), produciéndose por ello una gran vaporización. El contacto del agua con la caldera del volcán produce elevaciones de agua, ruido y gran cantidad de vapor. En la provincia de Candarave también existen otras fuentes de aguas

termales: Cerro Pelado, Pallata y Quilahuani, todas situadas en la puna pero ninguna tiene la espectacularidad de Calientes debido a los géiseres. Calientes, Candarave es la zona de mayor cantidad de surtidores (géiser), del sur del Perú. La provincia de Candarave situada al extremo norte de la región Tacna, limita con Puno y es una zona despoblada, de habitat silvestre y aislada, a pesar de que solo dista 167 km de la ciudad de Tacna (Olivera, 2013).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material Biológico

- *Bacillus licheniformis*.BTA-03.
- Enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*.

### 2.2 Método

#### 2.2.1. Diseño de experimentos y tratamiento estadístico de los datos

El tipo de investigación fue básica descriptiva, se utilizó un diseño completamente aleatorio (D. C. A.) descrito por Rios (2012) con dos repeticiones, donde para la determinación cualitativa de la actividad enzimática de la enzima se tuvo 5 tratamientos: 0, 24, 48, 72, 96 horas, y la variable respuesta fue el diámetro en mm de las zonas de hidrólisis del almidón.

Para la producción de enzima se utilizó un diseño completamente aleatorio (D. C. A.) descrito por Rios (2012)

con dos repeticiones, donde tuvo 7 tratamientos: 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, y las variables respuestas fueron la concentración de azúcares reductores, concentración de proteínas y densidad óptica a 600 nm. En la comparación de la  $\alpha$ -amilasa purificada con sulfato de amonio y sin purificar se comparó las medias al 95 % de confiabilidad con la prueba de Tukey, para probar la existencia de diferencias significativas.

Y por último para la determinar la actividad enzimática se utilizó un diseño completamente al azar con dos repeticiones, para el caso del efecto del pH tuvo 5 tratamiento: 5, 6, 7, 8 y 9, y la variable respuesta fue las Unidades de actividad enzimática (U) por mililitro; en cuanto al efecto de la temperatura tuvo 6 tratamientos: 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C, siendo la variable respuesta las Unidades de actividad enzimática (U) por mililitro, y el efecto de la concentración de sustrato g/ml, siendo la variable respuesta la velocidad ( $\mu\text{mol}/\text{minutos}$ ) . La concentración y la velocidad se invirtieron para obtener la  $V_{\text{max}}$  y el  $K_m$  de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Los diseños fueron analizados con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

### **2.2.2. Obtención de *Bacillus licheniformis* BTA-03**

*Bacillus licheniformis* BTA-03 fue donada por el M. Sc Roberto Castellanos Cabrera, la cepa se obtuvo de los géiseres de Calientes-Candarave que se encuentra a 4400 msnm, 70 12'15" de longitud Oeste, 17 15'30" latitud Sur y se aisló en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición; la identificación molecular y el análisis de las secuencias se hizo en MacroGen.

*Bacillus licheniformis* BTA-03 fue repicada en un tubo de ensayo con tapa rosca con agar nutritivo, para la posterior utilización.

### **2.2.3. Determinación de la actividad cualitativa de la hidrólisis del almidón**

La cepa fue sembrada por puntura y por duplicado en placas Petri con un medio sólido:  $\text{KHPO}_4$  0,03 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,07 %, almidón 1 %, extracto de levadura 0,3 %, peptona 0,5 %,  $\text{Mg SO}_4$  0,5 %,  $\text{Fe SO}_4$  0,01 %,  $\text{NaCl}$  0,3 %, agar 1,5 – 2 % (Fooladi & Sajjadian, 2010) con un pH a 7, incubándolas a  $60 \pm 1$  °C. Cada 24 horas se bañó con lugol y se midió el tamaño de la zona transparente alrededor de la colonia.

### **2.2.4. Determinación de la actividad cuantitativa de la $\alpha$ -amilasa**

#### **2.2.4.1. Producción de enzima en medio líquido**

Se obtuvo un inóculo del 2 % ( $10^6$  células/ml), y se inoculó en 1,1 L de caldo con los siguientes componentes:  $\text{KHPO}_4$  0,03 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,07 %, almidón 1 %, extracto de levadura 0,3 %, peptona 0,5

%, Mg SO<sub>4</sub> 0,5 %, Fe SO<sub>4</sub> 0,01 % y NaCl 0,3 %, a un pH 7, temperatura de 60 °C durante 72 horas. El crecimiento de la bacteria, la concentración de azúcares reductores y de proteínas se determinó a partir de alícuotas de 1,5 ml recogidos cada 12 h (Annamalai et al., 2011). El crecimiento se estimó por turbidimetría y la densidad óptica del caldo de cultivo se midió a 600 nm en espectrofotómetro (GREETMED, Modelo NV-203). El método descrito por Miller (1959), se usó para determinar la concentración de azúcares reductores usan el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a una absorbancia de 540 nm, Así mismo se realizó la curva patrón para obtener las concentraciones. El método descrito por Bradford (1976) se utilizó para medir la concentración de proteínas, se obtuvo las concentraciones con la ayuda de una curva patrón.

#### **2.2.4.2. Purificación con sulfato de amonio de la enzima $\alpha$ -amilasa**

El caldo de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min. Se midió el volumen de lo fermentado registrándolo, luego según la tabla de saturación a 60 y a 80 % se calculó la masa del sulfato de amonio que se agregó al beaker mediante agitación para cada porcentaje por separado empezando con 60 % y luego con 80 % y se agitó lentamente por unos 15 minutos, se dejó reposar por 30 minutos y se centrifugó por 20 minutos a 10 000 RPM guardando el pellet guardó en un Eppendorf a 4 °C; y por último el sobrenadante se saturó a 80 %, siguiendo los mismos pasos ya descritos.

#### **2.2.5. Caracterización enzimática**

El ensayo de amilasa se basa en la reducción concentración de almidón por la hidrólisis enzimática (Rath, 2003). La reacción contenía 20  $\mu$ l de enzima

(sobrenadante libre de células) y 500 µl de solución de almidón al 1 %, se incubó a 60 ° C durante 5 min. Se añadió 50 µl de solución de yodo (0,05 % de yodo en 0,5 % KI). La densidad óptica de la solución de color azul se determinó a 640 nm. El mismo procedimiento se repitió usando 20 µl de agua en lugar de la muestra de enzima destilada con el fin de medir la densidad óptica sin la enzima (Souza & Leal, 2000). Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que permite la hidrólisis de 10 mg de almidón (Aguilar et al, 2000) en 30 min en 60 ° C.

#### **2.2.5.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

El pH óptimo para la actividad de la enzima se determinó mediante la medición de la actividad  $\alpha$ -amilasa a diferentes pH usando los siguientes tampones (0,1 M): acetato de sodio (pH 5,0), fosfato de sodio (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8), glicina-tampón de NaOH (pH 9) y 1 % de almidón soluble como sustrato a 60 °C.

### **2.2.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática**

La temperatura óptima para la actividad de la enzima se evaluó mediante la medición de la actividad  $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas (40-90 °C) en tampón de fosfato de sodio 0,1 (pH 7,0) y 1 % de almidón soluble.

### **2.2.5.3. Determinación del $K_m$ y $V_{max}$ de la enzima**

Se utilizarán siete concentraciones diferentes de almidón soluble (0,5-4 g/mL). Las mediciones de actividad se realizaron bajo las condiciones normales del ensayo.

La estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  se realizó a partir de la alineación de Lineweaver-Burk. La ecuación es cuando se representa  $1/V_o$  contra  $1/[S]$ , obteniéndose una línea recta. La pendiente de la recta es  $K_m/V_{max}$  y la intersección sobre el eje  $1/V_o$  es  $1/V_{max}$ . La intersección sobre el eje  $1/[S]$  es  $-1/k_m$ .

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Determinación de la actividad enzimática cualitativa

**Tabla 7:** Análisis de varianza del diámetro del halo alrededor de la colonia por tiempo

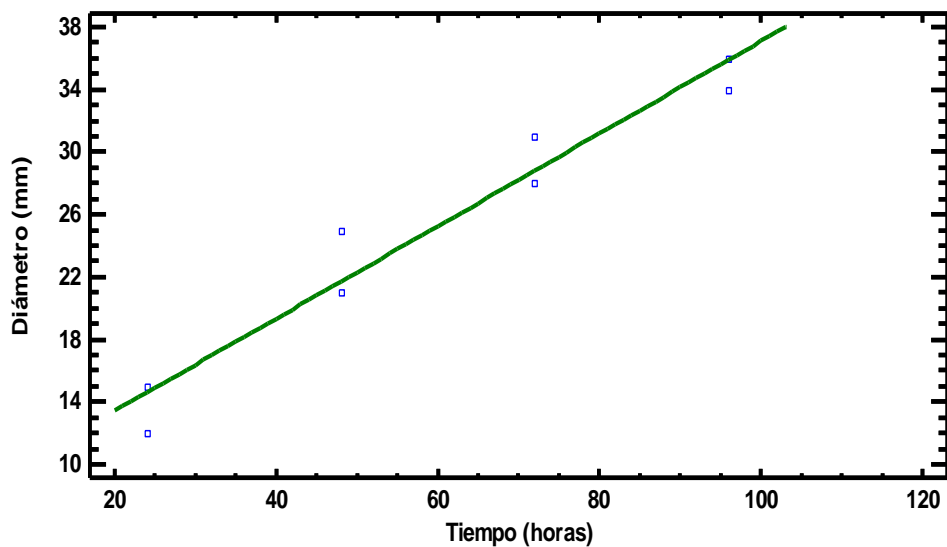
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	512,5	3	170,833	35,96	0,0024
Intra grupos	19,0	4	4,75		
Total (Corr.)	531,5	7			

Fuente: Elaboración propia.

#### Interpretación:

La Tabla 7 se observa la razón-F, que en este caso es igual a 35,9649, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre el Diámetro entre un nivel de tiempo y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo

afecta al diámetro de la zona de hidrólisis del almidón producida por la enzima  $\alpha$ -amilasa.



**Figura 8:** Modelo ajustado de la regresión lineal de tiempo vs diámetro de la zona de hidrólisis del almidón.

Fuente: Elaboración propia.

### **Interpretación:**

En la figura 8 se observa el modelo ajustado de un modelo lineal para describir la relación entre diámetro de la zona de hidrólisis del almidón y el tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Diámetro} = 7,5 + 0,29583 \cdot \text{Tiempo}$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 93,9856 % de la variabilidad en Diámetro.

### 3.2 Determinación de la actividad cuantitativa de la $\alpha$ -amilasa

#### 3.2.1. Producción de enzima en medio líquido

- Crecimiento de *Bacillus licheniformis* BTA-03

**Tabla 8:** Análisis de varianza del crecimiento bacteriano en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en medio líquido.

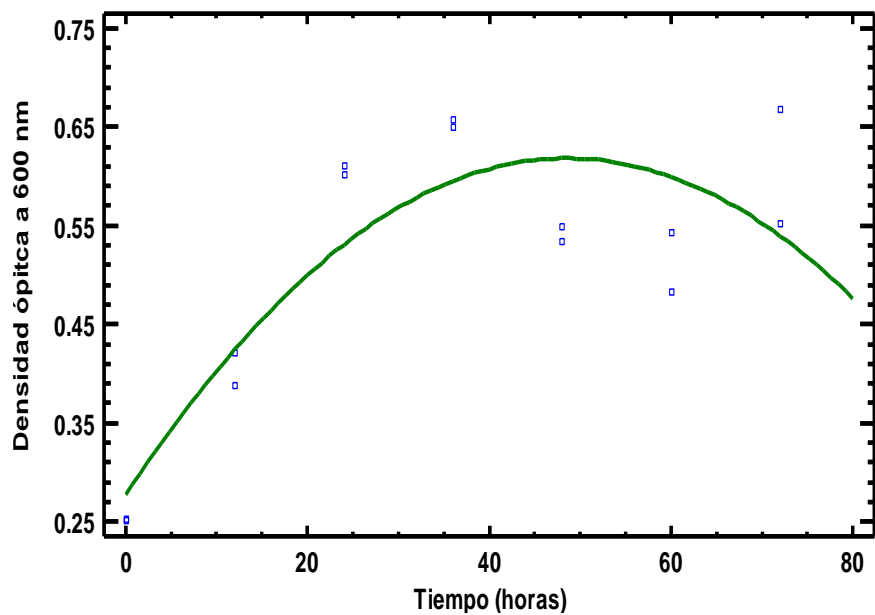
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,237585	6	0,0395976	29,88	0,0001
Intra grupos	0,0092755	7	0,00132507		
Total (Corr.)	0,246861	13			

Fuente: Elaboración propia.

#### Interpretación:

La Tabla 8 se observa que la razón-F, igual a 28,88, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado

dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media del diámetro del halo entre un nivel de Tiempo y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo afecta al crecimiento bacteriano de *Bacillus licheniformis*.



**Figura 9:** Modelo ajustado de la regresión lineal de tiempo vs crecimiento bacteriano en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en el medio líquido.

Fuente: Elaboración propia.

### **Interpretación:**

En la figura 9 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre el tiempo y el crecimiento bacteriano de *Bacillus licheniformis* en la producción de la enzima  $\alpha$ -amilasa en medio líquido y. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Densidad óptica} = 0,277 + 0,014 * \text{Tiempo} - 0,0001 * \text{Tiempo}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 67,9654 % de la variabilidad en la concentración de proteínas.

De la ecuación se obtuvo que la fase estacionaria estimada es a las 48,63 horas.

- **Concentración de azúcares reductores**

**Tabla 9:** Análisis de varianza de la concentración de azúcares reductores en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en medio líquido.

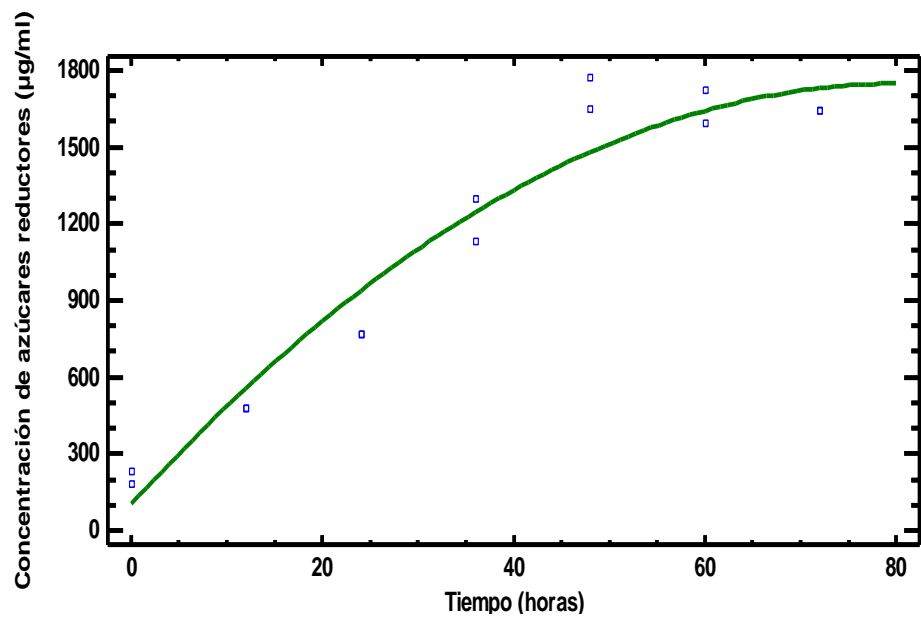
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,71082E6	6	785137	14,54	0,0012
Intra grupos	378045	7	54006,4		
Total (Corr.)	5,08887E6	13			

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

La Tabla 9 se observa que la razón-F, donde es igual a 14,5379, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de Concentración de azúcares entre un nivel de Tiempo y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo

afecta a la concentración de azúcares reductores que es producida por la actividad de la  $\alpha$ -amilasa frente al almidón.



**Figura 10:** Modelo ajustado de la regresión polinomial de tiempo vs concentración de azúcares reductores en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Elaboración propia.

### Interpretación:

En la figura 10 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la

concentración de azúcares reductores en la producción de la enzima  $\alpha$ -amilasa y el tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Concentración de azucares} = 1,869 + 40,604 * \text{Tiempo} - 0,254 * \text{Tiempo}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 80,4134 % de la variabilidad en la concentración de azúcares reductores.

De la ecuación anterior se obtuvo que la concentración máxima estimada de azúcares reductores fue a las 80 horas.

- **Concentración de proteínas**

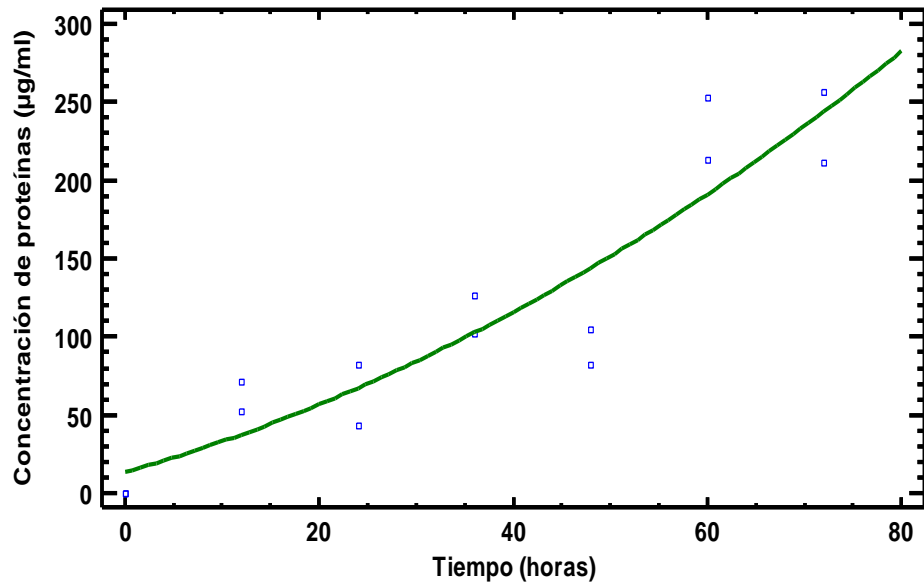
**Tabla 10:** Análisis de varianza de la concentración de proteínas en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	64957,3	6	10826,2	22,84	0,0003
Intra grupos	3317,47	7	473,924		
Total (Corr.)	68274,8	13			

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la Tabla 10 se observa que la razón-F, igual a 22,84; es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de Concentración de proteínas entre un nivel de Tiempo y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo afecta a la concentración de proteínas que es producida por la actividad de la  $\alpha$ -amilasa frente al almidón.



**Figura 11:** Modelo ajustado de la regresión polinomial de tiempo vs concentración proteínas en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la figura 11 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la concentración de proteínas en la producción de la enzima  $\alpha$ -amilasa y el tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Concentración de proteínas} = 97,7915 - 2,524 * \text{Tiempo} + 0,066 * \text{Tiempo}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 76,204 % de la variabilidad en la concentración de proteínas.

De la ecuación anterior se obtuvo que la concentración de proteínas máxima a las 19 horas.

### 3.2.2. Purificación con sulfato de amonio

**Tabla 11:** Análisis de varianza de la enzima purificada (con sulfato de amonio) y no purificada frente a la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	109,676	1	109,676	415,05	0,0024
Intra grupos	0,528502	2	0,264251		
Total (Corr.)	110,205	3			

Fuente: Elaboración propia.

### Interpretación:

En la Tabla 11 se observa la razón-F, donde es igual a 415,05; es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de las actividades enzimáticas (U/mg) entre la enzima sin purificar y la enzima purificada con sulfato de amonio, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que la purificación con sulfato de amonio afecta considerablemente a la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

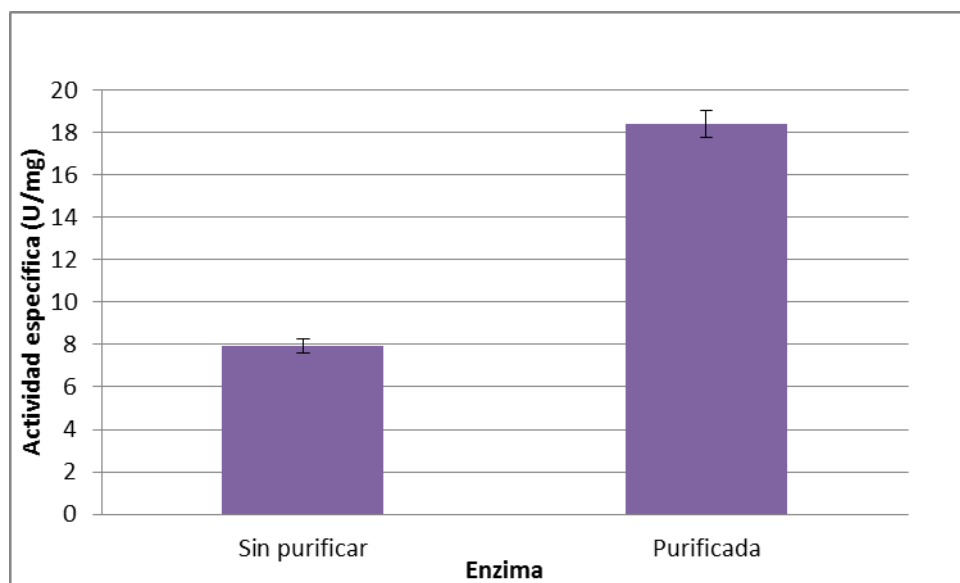
**Tabla 12:** Prueba de Tukey para la comparación de la enzima purificada y no purificada frente a la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Enzima</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Sin purificar	2	7,916	X
Purificada	2	18,388	X

Fuente: Elaboración propia.

### Interpretación:

En la Tabla 12 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles, puesto que no comparten una misma columna de X., por ende la actividad específica de la enzima purificada con respecto a la enzima no purificada son significativamente diferentes con un intervalo de confianza simultáneos de Tukey del 95 %.



**Figura 12:** Gráfico de medias de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa purificada y sin purificar con sulfato de amonio.

Fuente: Elaboración propia.

### Interpretación:

En la figura 12 se muestra las medias de la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa purificada y sin purificar con sulfato de amonio, es así que la figura muestra que hay una diferencia significativa cuando la enzima está purificada con sulfato de amonio teniendo una media de 18,388 U/mg, comparando con la enzima no purificada con una media de 7,916 U/mg.

### 3.2.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

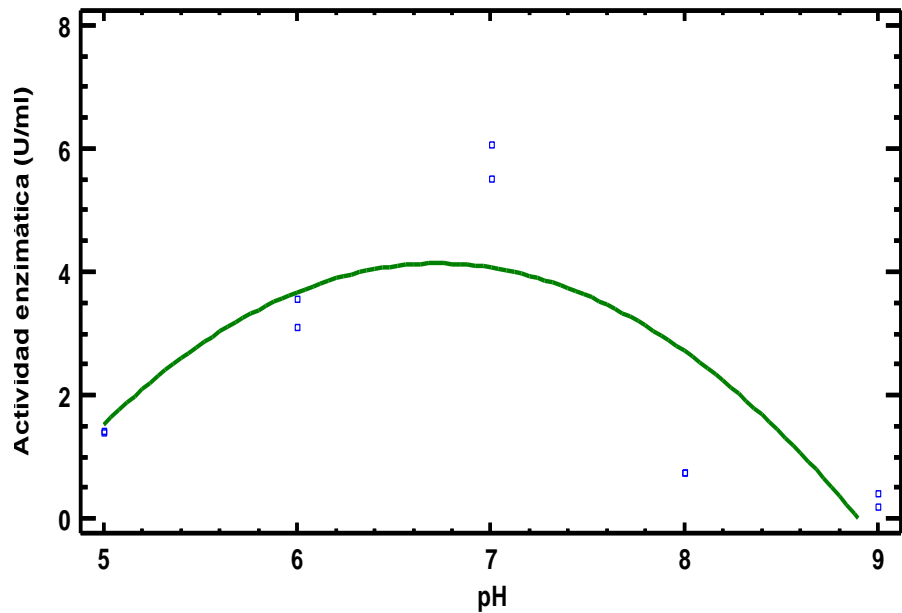
**Tabla 13:** Análisis de varianza para actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a diferentes pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41,0222	4	10,2556	183,84	0,0000
Intra grupos	0,278929	5	0,0557858		
Total (Corr.)	41,3012	9			

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la Tabla 13 se observa la razón-F, igual a 183,84; es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de la actividad enzimática (U/ml) entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que los diferentes pH afectan a la actividad enzimática (U/ml).



**Figura 13:** Modelo ajustado de la regresión polinomial de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa vs el pH.

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la figura 13 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre la actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa y el pH. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Actividad enzimática} = -35,495 + 11,785 \cdot \text{pH} - 0,876 \cdot \text{pH}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 52,729 % de la variabilidad en la concentración de proteínas. 43,464

De la ecuación se obtuvo que el pH óptimo estimado es de 6,7 y con una actividad de 4,14 U/ml.

### 3.2.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

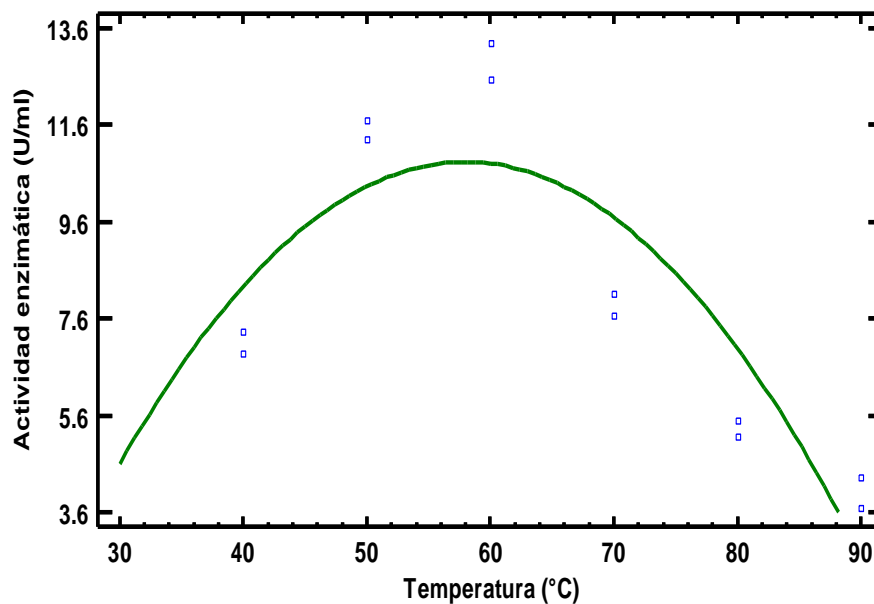
**Tabla 14:** Análisis de varianza para actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	120,293	5	24,0587	178,19	0,0000
Intra grupos	0,810097	6	0,135016		
Total (Corr.)	121,103	11			

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

La Tabla 14 se observa la razón-F igual a 178,19; es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de la actividad enzimática (U/ml) entre un nivel de temperatura y otra, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que las diferentes temperaturas afectan a la actividad enzimática (U/ml).



**Figura 14:** Modelo ajustado de la regresión polinomial de temperaturas vs la actividad enzimática (U/ml) de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la figura 14 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre las temperaturas y la actividad enzimática (U/ml) de la  $\alpha$ -amilasa. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Actividad enzimática} = -15,895 + 0,922 \cdot \text{Temperatura} - 0,008 \cdot \text{Temperatura}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 69,322 % de la variabilidad en la actividad enzimática (U/ml).

De la ecuación se obtuvo que la temperatura óptima estimado es de 58 °C y con una actividad de 10,669 U/ml.

### 3.2.5. Determinación del $K_m$ y $V_{max}$ .

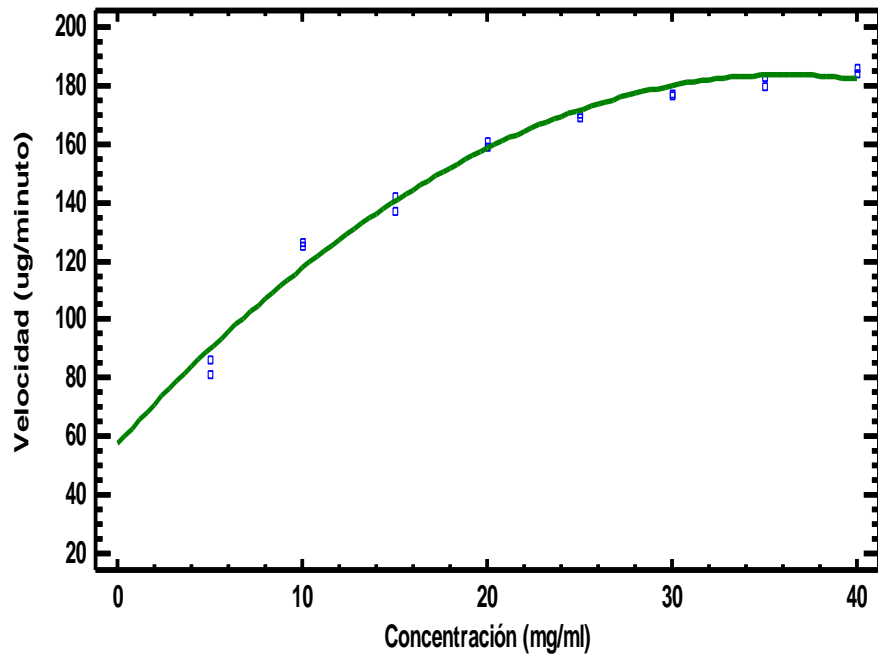
**Tabla 15:** Análisis de varianza de la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa a diferentes concentraciones de sustrato.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16790,7	7	2398,67	491,93	0,0000
Intra grupos	39,0086	8	4,87607		
Total (Corr.)	16829,7	15			

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la Tabla 15 se observa la razón-F, que en este caso es igual a 491,93; es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente altamente significativa entre la media de la velocidad de la enzima ( $\mu\text{g}/\text{minuto}$ ) entre un nivel de la concentración de sustrato ( $\text{mg}/\text{ml}$ ) y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que las diferentes concentraciones de sustrato afectan a la velocidad de la enzima  $\alpha$ -amilasa.



**Figura 15:** Modelo ajustado de la regresión polinomial de la concentración de sustratos vs la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

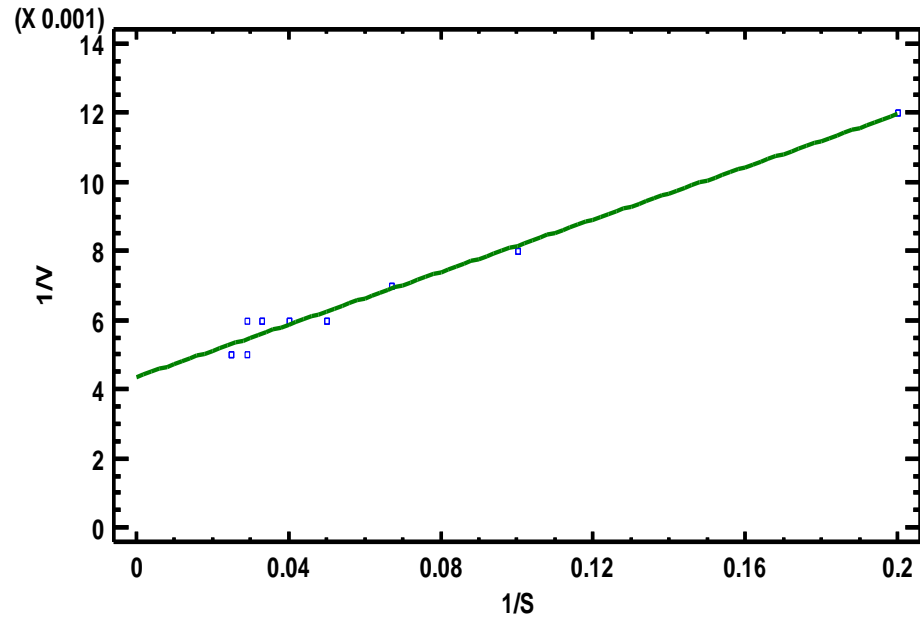
En la figura 15 se observa el modelo ajustado de un modelo polinomial para describir la relación entre las diferentes concentraciones del sustrato frente a la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Velocidad} = 57,454 + 6,982 * \text{Concentración} - 0,097 * \text{Concentración}^2$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 97,8921 % de la variabilidad de la velocidad de la enzima.

De la ecuación se obtuvo que la concentración óptima estimada es de 36,12203 mg/ml.

6



**Figura 16:** Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustratos vs la inversa de la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

En la figura 16 se observa el modelo ajustado de un modelo lineal para hallar la  $V_{max}$  y el  $K_m$ . La ecuación del modelo ajustado es:

$$1/V = 0,004 + 0,004*1/S$$

El estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados es 98,1592 % de la variabilidad.

De la ecuación se obtuvo que la  $V_{max}$  estimada de la  $\alpha$ -amilasa que es 229,537  $\mu\text{g}$  de almidón hidrolizado/ml/minuto y el  $K_m$  estimado de la  $\alpha$ -amilasa que es 8,724 mg/ml.

## IV. DISCUSIÓN

### Actividad enzimática cualitativa

La formación del halo alrededor de la colonia indica que la cepa de *Bacillus licheniformis* produce una  $\alpha$ -amilasa extracelular capaz de hidrolizar el almidón (Calcavante et al., 2013); dado que el yodo del lugol tiene la característica de unirse a los polímeros del almidón (Xiao et al., 2007). Por otro lado la lectura se hizo cada 24 horas, debido que a las 12 horas no presentó halo alrededor de la colonia, siendo así que la cepa en medio sólido empieza a producir la enzima a las 24 horas aproximadamente.

Cavalcante et al. (2013), señala que la cepa de *Bacillus subtilis* LB5a, cepa de Bioflavors Laboratory, presentó un halo de 12 mm a las 72 horas e incluso tuvo un considerable crecimiento de la colonia. En contraste con la cepa de *Bacillus licheniformis*, aislada de los géiseres de Calientes, tuvo un halo de 29,5 mm a las 72 horas, siendo el halo más grande que el de la cepa de *Bacillus subtilis* LB5a; también presentó un crecimiento significativo de la colonia. La alta velocidad de crecimiento de las colonias podría explicarse por el hecho de que los carbohidratos son

la fuente de carbono preferida para los microorganismos del género *Bacillus* (Barros et al., 2008).

### **Producción de la enzima en medio líquido**

La producción de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* fue de crecimiento independiente, la producción máxima estimada de la concentración de azúcares reductores y por ende de la enzima, fue a las 80 horas (concentración de azúcares reductores) y 19 horas (concentración de proteínas), alcanzando su máximo en el caso de la concentración de azúcares reductores en la fase de declive de la bacteria y el máximo en el caso de la concentración de proteínas en la fase exponencial de *Bacillus licheniformis* BTA-03 ; la fase estacionaria fueron a las 48,63 horas. Esto resulta que la producción de enzima es producida en la fase logarítmica de la bacteria pero no está relacionada con el crecimiento de la bacteria ya que la producción máxima no coincide con la fase estacionaria de la bacteria registrado en otros trabajos, así como estos autores Dohara et al. (2011) y Moshfegh et al. (2013), en el cual la  $\alpha$ -amilasa es producida en la fase logarítmica y alcanzando su máximo en la fase estacionaria. Por otro lado el almidón soluble sirve como la mejor fuente de carbono para el crecimiento máximo de la bacteria y para la

producción de enzima, un fenómeno descrito para un número de cepas del género *Bacillus* que secretan esta enzima (Lin et al., 1998).

El método de Bradford descrito por Bradford (1976), está basado en el colorante Coomassie brilliant blue G-250, que cambia de color con respecto a las concentraciones proteicas interaccionando con los aminoácidos básico, convirtiendo el color rojo a azul.

### **Purificación con Sulfato de Amonio**

La  $\alpha$ -amilasa se purificó por precipitación con sulfato de amonio gracias a que es muy soluble, y actúa haciendo una precipitación salina o salting out de las proteínas, y cuando aumenta mucho la cantidad de iones extraños, la interacción proteína- proteína se hace mayor que la interacción proteína-agua (Teijón & Garrido, 2006). La fracción que presentó mejor actividad amilolítica fue la saturada al 60 %, coincidiendo con el reporte de Montor (2013). Es posible que los dos diferentes porcentajes de saturación del extracto crudo enzimático con sulfato de amonio indiquen la cantidad de aminoácidos hidrofílicos exteriores contenidos en la estructura proteica (Demirjian et al., 2006). La enzima purificada con sulfato de amonio tuvo una media de 18,388 U/mg,

comparado con la enzima no purificada con una media de 7,916 U/mg, con un fraccionamiento de 2,3 veces la purificación; esto indica que como la concentración de  $\alpha$ -amilasa aumentó, la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa aumentó también. Este comportamiento está de acuerdo con las observaciones de West, et al. (1967), que indicó que dentro de límites bastante amplios la velocidad de la concentración de la enzima es directamente proporcional a la concentración de enzima. En cuanto al fraccionamiento que fue de 2,3 veces la purificación, así como en las investigaciones de los autores El-Safey & Ammar. (2004); en donde purificó una  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, su fraccionamiento fue de 5,66 veces la purificación.

### **Efecto del pH y Temperatura frente a la actividad enzimática**

El efecto del pH en la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa fue estudiada a un intervalo de pH de 5,0 a 9,0; a 60 °C. La mayor actividad enzimática (4,14 U/ml) bajo esas condiciones se registró a pH de 6,7 (Figura 13). En el pH 6 la enzima mostró 58 % de la actividad, pero a un pH de 8 la actividad bajó a 13 %, a pH 5 y 9 la actividad cayó a 24 % y 5,266 % respectivamente. Entonces, se observa una fuerte reducción de la actividad enzimática en medios básicos. La mayoría de las enzimas que

degradan el almidón tienen un pH óptimo en el intervalo ácido a neutro (Pandey et al., 2000;). Las  $\alpha$ -amilasas producida por bacterias termófilas son activas a un pH que varía del intervalo de 6,0-8,0 (Liebl et al., 1997) o 5,0-7,0 (Leveque et al., 2000; El Safey & Ammar, 2004). El pH óptimo de la enzima purificada concuerda con lo reportado por varios autores; el pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* fue de 7 (Al-Qoda, 2006), de *Bacillus licheniformis* GCBU8 fue de un rango 6 a 8 (Kim et al.,1992) ; de *Nesterenkonia* sp fue de 7 a 7,5 (Shafeie et al., 2012), y de *Bacillus licheniformis* fue de 7,5 (Monteiro et al., 2010). Lo cual demuestra que el pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa se inclina hacia un valor más neutral

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática fue estudiado a un intervalo de 40 °C a 90 °C; a un pH de 7. La mayor actividad enzimática (10,669U/ml) bajo esas condiciones se registró a una temperatura de 58,01 °C (Figura 14). A la temperatura de 55 °C la enzima mostró 89 % de la actividad, a 70 °C mostró 61,31 %, a 40 °C mostró 55,08 %, a 80 °C y a 90 °C bajó a 41,50 % y a 31, 01 % respectivamente; lo cual demuestra que la enzima a 90 °C aún no se ha desnaturalizado y presenta actividad (Montor, 2013). La actividad a 40 °C se reduce y esto puede atribuirse a la reducción de la flexibilidad molecular de la proteína termófila en condiciones mesófilas

(Dobara et al., 2011). Por otro lado, Abd El-Rahman, (1990) y Lin et al, (1998), llegaron a la conclusión de que, la temperatura óptima para  $\alpha$ -amilasa purificada van de 30 a 85 °C, lo cual concuerda con la enzima purificada. La temperatura óptima (58 °C) de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* resulta coincidente con lo reportado en otras investigaciones donde se estudia a las  $\alpha$ -amilasas de bacterias del género *Bacillus*; siendo así que la temperatura óptima de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 (Deb et al., 2013), *Bacillus subtilis* (Jancy & Karutha, 2013), *Bacillus* sp. BBM1 (Quintero et al., 2010) fue de 60 °C, y la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus* sp., aislada de aguas termales de Iran, tuvo una temperatura óptima de 60 a 80 °C (Fooladi & Sajjadian, 2010). La  $\alpha$ -amilasa obtenida tiene una temperatura óptima mayor que otras  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus licheniformis*, Monteiro et al. (2010) reportó una temperatura óptima de 40 °C de una cepa de *Bacillus licheniformis* GCBU8 y Kim et al. (1992) reportó una amilasa con temperatura óptima de 50 °C. Por ende la enzima  $\alpha$ -amilasa se distingue por ser una temperatura intermedia estable (ITS) (El Sayed et al., 2013).

### **Determinación del $K_m$ y $V_{max}$**

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  a 60 ° C y a pH 7 fueron 8,724 mg / ml y 229,537  $\mu$ g de almidón hidrolizado / ml / min, respectivamente. Aunque es difícil comparar los valores cinéticos de amilasas obtenidas por otros trabajos, en vista de los diferentes sustratos de almidón utilizados y las condiciones de ensayo. El valor de  $K_m$  de la  $\alpha$ -amilasa con almidón como sustrato (8,7 mg / ml) indica que en comparación con la  $\alpha$ -amilasa de *Pyrococcus furiosus* (Laderman et al., 1993), la enzima tiene una afinidad menor (mayor  $K_m$ ) para el almidón; pero una afinidad mayor comparando con la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus alcalophilus* (Yang et al., 2011). Sin embargo, el valor de  $K_m$  está dentro del rango de las  $\alpha$ -amilasas (0,35 a 11,66 mg / ml) (Najafi & Kembhavi, 2005).

## V. CONCLUSIONES

1. La actividad cualitativa de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* BTA-03 se obtuvo midiendo los halos formados por la degradación del almidón en medio sólido, teniendo un halo de 35 mm a las 93 horas.
2. Se produjo la enzima  $\alpha$ -amilasa en medio líquido a partir de *Bacillus licheniformis* BTA-03 fue comparado con el crecimiento de la bacteria encontrándose que la enzima se empieza a producir en la fase logarítmica de la bacteria.
3. Se purificó la enzima con Sulfato de amonio teniendo un fraccionamiento de 2,3 veces la purificación.
4. EL pH óptimo de la enzima fue 6,7 con una actividad enzimática de 4,14 U/ml.
5. La temperatura óptima de la enzima fue 58,0 °C con una actividad enzimática de 10,669 U/ml.

6. La  $V_{\max}$  y el  $K_m$  de la enzima  $\alpha$ -amilasa fueron 229,537  $\mu\text{g}$  de almidón hidrolizado/minuto y 8,724 mg/ml, respectivamente.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere que cuando se trabaje con enzimas se logre purificar hasta electroforesis para tener el peso molecular de la enzima y liofilizarla para que no pierda sus características enzimáticas.
2. Se sugiere que en investigaciones posteriores de la caracterización enzimática de la  $\alpha$ -amilasa se realice la prueba de la termoestabilidad de la enzima.
3. Se sugiere que en investigaciones posteriores de la caracterización enzimática de la  $\alpha$ -amilasa se evalúe la interacción del pH con diferentes temperaturas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abd El-Rahman, E.** (1990). Studies on some thermophilic bacterial strains. Tesis Ph.D., Universidad Al-Azhar., Cairo, Egypt.
2. **Ageitos, J.** (2011). Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 2213h
3. **Aguilar, G.; Morlon, J.; Trejo, B. & Guyot, J.** (2000). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*. 406 – 413p.
4. **Alfaro, C.** (2002). Geoquímica del sistema geotérmico de Paipa. *Ingeominas. Bogotá D.C.* 2-5 p
5. **Al-Qodah, Z.** (2006). Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnologu J.* 1: 850-857.

6. **Annamalai, N.; Thavasi, R.; Vijayalakshmi, S. & Balasubramanian, T.** (2011). Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ - Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51(4): 424-429.
  
7. **Asgher, M., Javaid, A., Rahman, S. & Legge, R.** (2006) .JFE.
  
8. **Barros, C.; Ponezi, N.; and Pastore, G.** (2008). "Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(9):1071–1078.
  
9. **Batrakov, S.; Rodionova, T.; Esipov, S.; Polyakov, N.; Sheichenko, V.; Shekhovtsova, N.; Lukin, S.; Panikov, N. & Nikolaev, Y.** (2003). A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Elsevier B.V.*, 1634(3):107-115.

- 10. Bradford M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- 11. Brena, B.; Pazos, C.; Franco, L. & Batista, F.** (1996). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 684, 217–237.
- 12. Cavalcante, F.; Resende, A.; Andrade, C.; & Pastore, G.** (2013). Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant- producing strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*. 1-9.
- 13. Chi, Z.; Chi, Z.; Liu, G.; Wang, F.; Ju, L. & Zhang, T.** (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 27, 423-431.
- 14. Couto, S. & Sanromán, M.** (2006) . Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.

- 15. Cortés, A.** (2004). Aplicación de Enzimas en la Producción Industrial. *Mundo Alimento*, 20-23.
- 16. Bautista, L.** (1997). Purificación de  $\alpha$ -amilasas de *Aspergillus oryzae* por adsorción. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 267h.
- 17. Beltrán, A. & Herreño, L.** (2010). Aplicación de la enzima  $\alpha$ -amilasa comercial ban® 480l a la harina de arroz de la variedad de arroz 50 para la elaboración de una bebida vegetal. Tesis de grado. Universidad de Salle- Colombia. 119h
- 18. Deb, P.; Ahmad, S.; Moshina, K.; Kumar, P.; & Abu, S.** (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Open Journal*, 2-12.
- 19. Demirjjan, D.; Moris, V. & Cassidi, C.** (2006). Enzymes from thermophiles. *Curr. Opin.Chem. Biol.* 5:144-151.
- 20. Dohara, M.; Sayed, A.; Fallal, A. & Omar, N.** (2011). Production and partial characterization of high molecular weight extracellular

$\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* Isolated from Egyptian Soil. Polish Journal of Microbiology. 60(1): 65– 71.

**21. Donohue, T. & Bernlohr, R.** (1978). Effect of cultural conditions on the concentrations of metabolic intermediates during growth and sporulation of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol*, 135:363–372.

**22. Eliécer, J.** (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1:09-15.

**23. El Safey, E. & Ammar, M.** (2004). Purification and characteraization of  $\alpha$ -amylase isolated from *Aspergillus falvus* var. *columnaris*. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7(1): 93-100.

**24. El Sayed, A.; Mohamed, I.; Abou, M.; El Fallal, A. & Omar, N.** (2013). Purification, sequencing, and biochemical characterization of a novel calcium-independent  $\alpha$ -Amylase AmyTVE from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Appl. Biochem Biotechnol*. 170:483-497.

- 25. Fooladi, J. & Sajjadian, A.** (2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ - amylase producing strain. *Iran Journal of Microbiology*, 2(1): 46-50.
- 26. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V. & Chauhan, B.** (2003). Microbial  $\alpha$  -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, 38, 1599-1616.
- 27. Gurung, N.; Ray, S.; Bose, S. & Rai, V.** (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research Internacional*, 1-18.
- 28. Henrissat B .**(1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J*, 280: 309-316.
- 29. Horváthová, V.; Janeček, S. & Sturdík, E.** (2001). Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties. *Gen. Physiol. Biophys*, 20: 7-32.

- 30. Jancy, B. & Karutha, S.** (2013). Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8–18. *Journal of Basic Microbiology*. 1-10.
- 31. Kim, I.; Cha, J.; Kim, J.; Jang, S.; Seo, B.; Cheong, T. & Lee, D.** (1992). Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* 267, 22108–22114.
- 32. Kirk, O.; Vedel, T. & Crone, C.** (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351.
- 33. Kuriki, T.; Hondoh, H. & Matsuura, Y.** (2005). The conclusive proof that supports the concept of the  $\alpha$ -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Biol. Bratislava*, 60: 13–16.
- 34. Krishna, M.; Chetty, Ch. & Suresh, Ch.** (2011). Fermentative production and thermostability characterization of  $\alpha$ -amylase from

*Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. *Biotechnology Research International*, 1-8.

**35. Koshland, D.** (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev*, 28, 416 – 43.

**36. Laderman, K.; Davis, B.; Krutzsch, H.; Lewis, M.; Griko, Y.; Privalov, P. & Anfinsen, C.** (1993). The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The journal of Biological Chemistry*. 268(32): 24394-24401.

**37. Latorre, L.** (2008). Análisis estructural y modificación funcional de la glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. Diastaticus. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia- España.135 h.

**38. Leveque, E.; Haye, B. & Belarbi, A.** (2000). Cloning and expression of an  $\alpha$ - amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol Lett*.186:67–71.

- 39. Liebl, W.; Stemplinger, I. & Ruile, P.** (1997). Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J Bacteriol.* 179:941–8.
- 40. Lin, L.; Chyau, C. & Hsu, W.** (1998) Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* K. TS-23. *Biotechnol Appl Biochem* 28:61–68.
- 41. Martínez, J.** (2005). Utilización de  $\alpha$ -amilasa en la formulación de detergentes industriales. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. 306 h.
- 42. Mikami, B.; Degano, M.; Hehre, E. & Sacchettini, J.** (1994). Crystal structures of soybean  $\beta$ -amylase reacted with  $\beta$ -maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis. *Biochem*, 33: 7779-7787.
- 43. Mikami B.** (2000). Structure of  $\beta$ -Amylase: X-ray Crystallographic Analysis In: *Glycoenzymes. Societies Press*, 55-81.

- 44. Miller G.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–429
- 45. Monteiro, P.; Oliveira, P. & Magalhães.** (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry- A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
- 46. Montor, J.** (2013). Caracterización de amilasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar. Tesis para grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad de Papaloapan-México. 87h.
- 47. Moshfegh, M.; Reza, A.; Zarrini, G. & Famarzi, M.** (2013). Biochemical characterization of an extracellular polyextremophilic  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Halorubrum xinjiangense*. *Extremophiles*. 17: 677-687.
- 48. Naidu, M. & Saranraj, P.** (2013). Bacterial Amylase: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(2): 274-287.

- 49. Najafi, M, & Kembhavi, A.** (2005) One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme Microb Technol* 36:535–539
- 50. Nielsen, J. E & Borchert, T.** (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophys. Acta Prot. Struc. and Mol. Enzymol*, 1543: 253–274.
- 51. Nonaka, T.; Fujihashi, M.; Kita, A.; Hagihara, H.; Ozaki, K.; Ito, S. & Miki, K.** (2003). Crystal structure of calcium-free  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. *Journal Biol. Chem.* 278: 24818–24824.
- 52. Norman, B.** (1981). "New developments in starch syrup technology" en: *Enzyme and food processing* (G.G. Birch, N.; Blakebrough y K.J. Parker Eds.), Applied Science Publishers, Londres, 15-50.
- 53. Olivera, G.** (2013). Los géiseres del Perú: Características y utilización turística. Escuela de Turismo y Hotelería

- 54. Pandey, A.** (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.
- 55. Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.; Soccol, V.; Singh, D. & Mohan, R.** (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. App. Biochem.* 31: 135-152.
- 56. Pandey, A.; Soccol, R. & Mitchell, D.** (2000). “New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products,” *Process Biochemistry*, vol. 35, no. 10, pp. 1153–1169.
- 57. Polaina, J.** (2004). Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *Mensaje Bioquímico.* 38: 137-188.
- 58. Ponce, N. & Pérez, A.** (2002). Celulasas y Xilanasas en la Industria Avance y Perspectiva. México. Pág 273-277.

- 59. Prakash, O. & Jaiswal, N.** (2010).  $\alpha$ -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnolo. India.* 160: 2401-2414.
- 60. Prasanna, V.** (2005). Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnol.* 4:1525-1529.
- 61. Prasanna, H.; Venkateswara, U.; Teswnth, S.; Swarupa, V.; Hari,O.; Lakshmi, M.; Venkata, P. & Sarma, k.** (2013). Molecular characterization of  $\alpha$ -amylase from *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Informatics.* 9(6): 281-285.
- 62. Pujadas, G. & Palau, J.** (1999). TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biol. Bratislava.* 54: 231-254.
- 63. Quintero, M. ; Montoya, O. & Gutiérrez, P.** (2010). Purificación y caracterización de una  $\alpha$ -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus sp.* BBM1.Dyan 162: 31-38.

- 64. Rani, G.; Paresh, G.; Harapriya, M.; Vineet, K.; & Bhavna, C.** (2003). Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599 – 1616.
- 65. Rath, C.** (2003). Thermophiles: A novel group of microorganisms for 21 st centur, 2003, OUAT, Bhubanewswar,751003.
- 66. Rawlings, N.; Morton, F. & Barrett, A.** (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34:270-272.
- 67. Rios, C.** (2012). *Estadística y diseño experimental*. Perú: Universitaria.
- 68. Rubiano, C.** (2006). Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaeróbicos lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá). Tesis Grado. Pontificia Javeriana, Colombia 104h.
- 69. Saito, N. & Yamamoto, K.** (1975). "Regulatory factors affecting alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis*", 1. *Bacteriol.*, 121 (3), 848-856.

- 70. Salva, T. & Moraes, I.** (1995). Rev. Microbiol. 26, 46–51.
- 71. Schallmey, M.; Singh, A. & Ward O.** (2004). Developments in the use of *Bacillus* species in industrial production. Can. J. Microbiol. 50:1-17.
- 72. Shafeie, M.; Ziaee, A. & Amoozegar, M.** (2012). Purification and characterization of a halophilic  $\alpha$ -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. Extremophiles. 16:627-635.
- 73. Singhania, R.; Patel, A.; Soccol, C. & Pandey, A.** (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 44, 13–18.
- 74. Sivaramakrishnan, S.; Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.; Soccol; C. & Pandey, A.** (2006).  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments. Food Technol. Biotechnol. 44: 173-184.

- 75. Souza, C. & Leal, M.** (2000). Culture condition for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazil. *Microbiol.*, 2000, 31: 298-302.
- 76. Steffolani, M.** (2010). Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos de panificación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 240h.
- 77. Syu, M. & Chen, Y.** (1997). *Chem. Eng. J.* 65, 237–247.
- 78. Tanyildizi, M.; Ozer, D. & Elibol, M.** (2007). Production of bacterial  $\alpha$ - amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.* 37, 294–297.
- 79. Teijón, J. & Garrido, A.** (2006). Fundamentos de bioquímica estructura. Editorial Tébar. 443pp.77-78
- 80. Todar, K.** (2005). Todar's online textbook of bacteriology: The genus *Bacillus*. Department of Bacteriology, University of Wisconsin
- 81. Tonkova, A; Manolov, R. & Dobрева, E.** (1993). "Thermostable alpha-amylase from derepressed *Bacillus licheniformis* produced in high yields from glucose", *Process Biochem.*, 28 (8),539-542.

- 82. Van der Maarel, M.; Van der Veen, B.; Uitdehaag, H.; Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L. (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal Biotechnol.* 94: 137–55.
- 83. Vargas, A. & Silver, L. (2002).** Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 82h.
- 84. Veith, B.; Herzberg, C.; Steckel, S.; Feesche, J.; Maurer, K.; Ehrenreich, P.; Baumer, S.; Henne, A.; Liesegang, H.; Merkl, R.; Ehrenreich, A. & Gottschalk, G. (2004).** The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:204-11.
- 85. Vihinen, M. & Mantsala, P. (1989).** Microbial amylolytic enzymes. *Biotech. Lab.* 24: 329- 418.

- 86. West, E.; Tood W.; Mason H. & Van Burggen J.** (1967). Text Book Of Biochemistry 4th ed. MacMillan Co., N. Y. Collier MacMillan Ltd., London.
- 87. Xiao, Z.; Storms, R. & Tsang, A.** (2007). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Centre for Structural and Functional Genomics. 1-3.
- 88. Yang, H.; Liu, L.; Li, J.; Du, G. & Chen, J.** (2011). Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. Microbial cell factories. 10: 1-9.

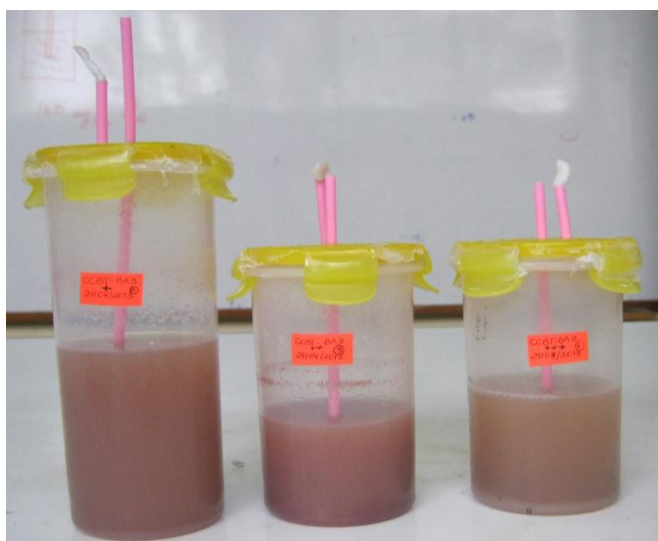
## VII. ANEXO

**ANEXO 1:** Fotografía del diámetro del halo alrededor de la colonia a las 24, 48 y 96 horas



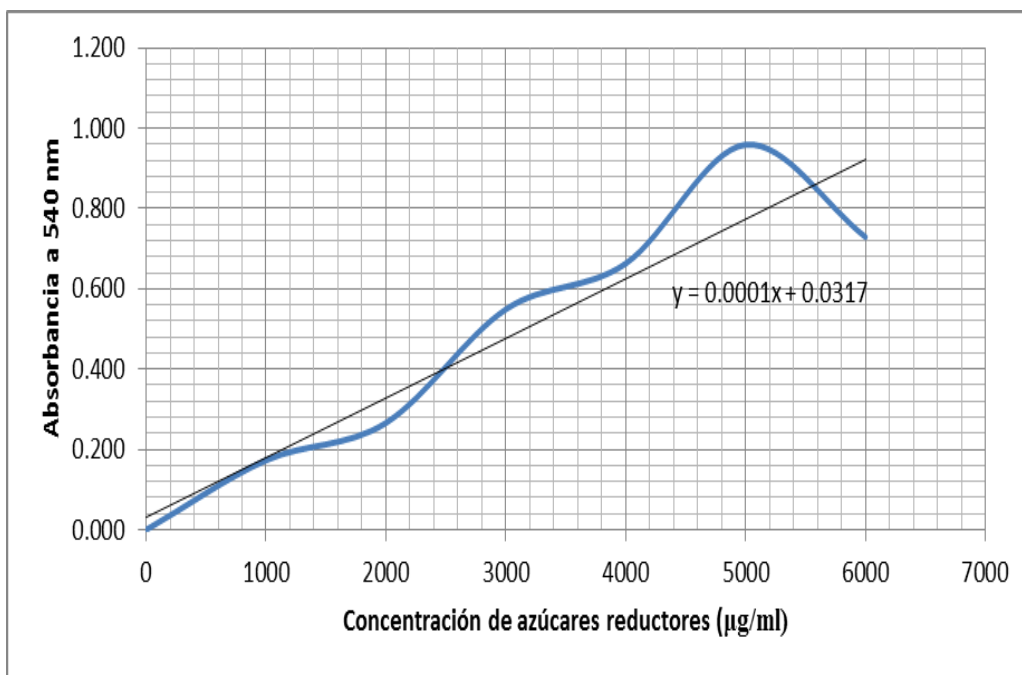
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 2:** Fotografía de la producción de la enzima a partir de *Bacillus licheniformis* BTA-03 en medio líquido.



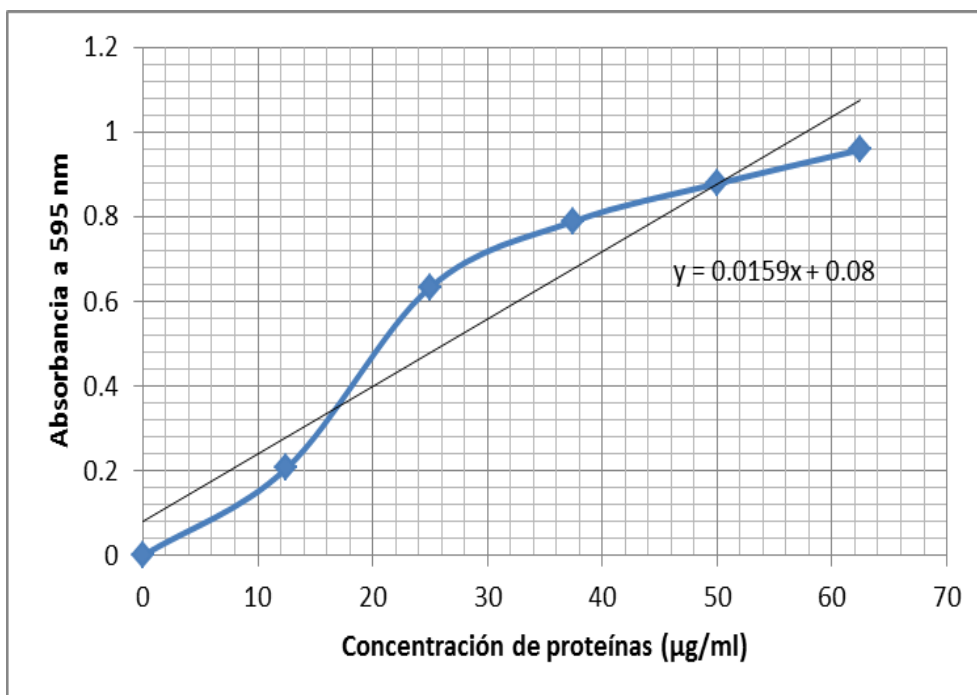
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 3:** Curva patrón de la concentración de azúcares reductores.



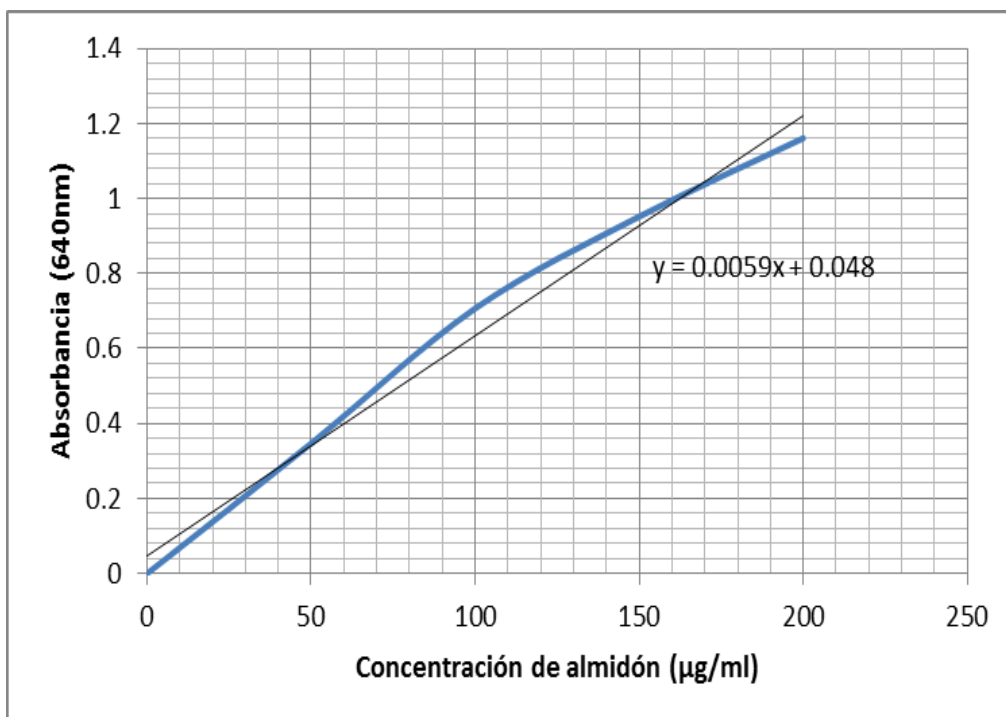
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 4:** Curva patrón de la concentración de proteínas.



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 5: Curva patrón de la concentración de almidón.**



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 6:** Datos de la actividad enzimática cualitativa de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Horas</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Diametro (mm)</b>
<b>24</b>	I	15
	II	12
<b>48</b>	I	25
	II	21
<b>72</b>	I	28
	II	31
<b>96</b>	I	34
	II	36

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 7:** Datos del crecimiento bacteriano de la cepa en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Horas</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Absorbancia a 600 nm</b>
<b>0</b>	I	0,253
	II	0,252
<b>12</b>	I	0,388
	II	0,422
<b>24</b>	I	0,603
	II	0,611
<b>36</b>	I	0,658
	II	0,651
<b>48</b>	I	0,549
	II	0,534
<b>60</b>	I	0,543
	II	0,483
<b>72</b>	I	0,669
	II	0,553

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 8:** Datos de la concentración de azúcares reductores en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Absorbancia 540 nm</b>	<b>Concentración de azúcares reductores (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>0</b>	I	0,05	183
	II	0,054	233
<b>12</b>	I	0,08	483
	II	0,08	483
<b>24</b>	I	0,109	773
	II	0,073	413
<b>36</b>	I	0,162	1303
	II	0,145	1133
<b>48</b>	I	0,166	1343
	II	0,209	1773
<b>60</b>	I	0,204	1723
	II	0,191	1593
<b>72</b>	I	0,196	1643
	II	0,156	1243

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 9:** Datos de la concentración de proteínas en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

Tiempo	Repeticiones	Absorbancia 595 nm	Concentración de proteínas ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	I	0	2,294
	II	0	2,294
12	I	0,117	71,118
	II	0,086	52,882
24	I	0,136	82,294
	II	0,07	43,471
36	I	0,17	102,294
	II	0,211	126,412
48	I	0,175	105,235
	II	0,136	82,294
60	I	0,358	212,882
	II	0,426	252,882
72	I	0,356	211,706
	II	0,432	256,412

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 10:** Datos de la purificación con sulfato de amonio de la  $\alpha$ -amilasa.

Enzima	Repetición	Absorbancia a 640 nm	Concentración de almidón	Actividad específica U/mg	Media (U/mg)	Desviación estándar
<b>Sin purificar</b>	I	0,54	82	7,681	7,916	0,331
	II	0,57	87	8,150		
<b>Purificada</b>	I	3,184	522,650	17,9307	18,388	0,647
	II	3,344	549,317	18,8456		

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 11:** Datos del efecto del pH en la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>pH</b>	<b>Repetición</b>	<b>Absorbancia a 640 nm</b>	<b>Concentración de almidón</b>	<b>Actividad enzimática U/ml</b>
<b>5</b>	I	0,402	59	1,415
	II	0,396	58	1,391
<b>6</b>	I	0,942	149	3,573
	II	0,828	130	3,118
<b>7</b>	I	1,566	253	6,067
	II	1,428	230	5,516
<b>8</b>	I	0,234	31	0,743
	II	0,234	31	0,743
<b>9</b>	I	0,15	17	0,408
	II	0,096	8	0,192

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 12:** Datos del efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

Temperatura	Repetición	Absorbancia a 640 nm	Concentración de almidón	Actividad enzimática U/ml
40	I	1,770	287	6,882
	II	1,884	306	7,338
50	I	2,976	488	11,703
	II	2,874	471	11,295
60	I	3,186	523	12,542
	II	3,372	554	13,285
70	I	1,968	320	7,674
	II	2,082	339	8,129
80	I	1,344	216	5,180
	II	1,422	229	5,492
90	I	0,972	154	3,693
	II	1,128	180	4,317

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 13:** Datos del efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

Concentración	Repetición	Absorbancia a 640nm	Concentración de almidón
0.5	I	0,304	38,317
	II	0,289	35,817
1	I	0,417	57,15
	II	0,422	57,983
1.5	I	0,468	65,65
	II	0,452	62,983
2	I	0,524	74,983
	II	0,518	73,983
2.5	I	0,551	79,483
	II	0,547	78,817
3	I	0,571	82,817
	II	0,569	82,483
3.5	I	0,578	83,983
	II	0,587	85,483
4	I	0,598	87,317
	II	0,592	86,317

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 14:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión lineal de la actividad cualitativa (diámetro vs. Tiempo).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	504,1	1	504,1	110,39	0,0000
Residuo	27,4	6	4,56667		
Total (Corr.)	531,5	7			

Fuente: Elaboración propia.

	<b>Mínimos Cuadrados</b>	<b>Estándar</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	7,5	1,85068	4,05257	0,0067
Pendiente	0,295833	0,0281571	10,5065	0,0000

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 15:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial del crecimiento bacteriano en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en medio líquido.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	0,179946	2	0,0899731	14,79	0,0008
Residual	0,0669146	11	0,00608315		
Total (Corr.)	0,246861	13			

Fuente: Elaboración propia.

		<b>Error</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	0,276786	0,0481393	5,74969	0,0001
Tiempo	0,0140417	0,00313156	4,48392	0,0009
Tiempo <sup>2</sup>	-0,000144345	0,0000417876	-3,45426	0,0054

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 16:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la concentración de azúcares reductores en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en medio líquido.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	4,34618E6	2	2,17309E6	97,71	0,0000
Residual	244646	11	22240,5		
Total (Corr.)	4,59083E6	13			

Fuente: Elaboración propia.

		<b>Error</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	102,571	92,0466	1,11434	0,2889
Tiempo	40,9182	5,98782	6,83356	0,0000
Tiempo <sup>2</sup>	-0,25434	0,0799016	-3,18317	0,0087

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 17:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la concentración de proteínas en la producción de la  $\alpha$ -amilasa en medio líquido.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	83922,7	2	41961,4	33,23	0,0000
Residual	13888,8	11	1262,62		
Total (Corr.)	97811,5	13			

Fuente: Elaboración propia.

		<b>Error</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	13,5785	21,9316	0,619129	0,5484
Tiempo	1,75279	1,4267	1,22857	0,2449
Tiempo <sup>2</sup>	0,0200845	0,0190379	1,05498	0,3141

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 18:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a diferentes pH.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	26,1161	2	13,0581	6,02	0,0301
Residual	15,1851	7	2,16929		
Total (Corr.)	41,3012	9			

Fuente: Elaboración propia.

		<b>Error</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-35,4945	13,2919	-2,67039	0,0320
pH	11,7847	3,91069	3,01344	0,0196
pH <sup>2</sup>	-0,876107	0,278343	-3,14758	0,0162

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 19:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión polinomial de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	90,7063	2	45,3532	13,43	0,0020
Residual	30,3971	9	3,37746		
Total (Corr.)	121,103	11			

Fuente: Elaboración propia.

		<b>Error</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-15,8948	8,62208	-1,8435	0,0984
Temperatura	0,921997	0,278227	3,31383	0,0090
Temperatura <sup>2</sup>	-0,00795	0,00212682	-3,73797	0,0046

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 20:** Análisis de varianza y prueba de hipótesis de coeficiente de regresión lineal de la inversa de la concentración de sustratos vs la inversa de la velocidad de la  $\alpha$ -amilasa.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	0,000069709	1	0,000069709	794,42	0,0000
Residuo	0,00000122847	14	8,77478E-8		
Total (Corr.)	0,0000709375	15			

Fuente: Elaboración propia.

	<b>Mínimos Cuadrados</b>	<b>Estándar</b>	<b>Estadístico</b>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0,00435428	0,000117831	36,9537	0,0000
Pendiente	0,0379886	0,0013478	28,1855	0,0000

Fuente: Elaboración propia.



Dr. Roberto Castellanos Cabrera

ASESOR



Bach. Cristina Isabel Ferrer Villena

TESISTA