

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**“Caracterización enzimática de una α -amilasa producida por la bacteria
termófila *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 aislada
del rumen bovino”**

TESIS

Presentada por:

Bach. Alonso Roberto Poma Ticona

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2021

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS DE PREGRADO N° 363.

En la ciudad de Tacna, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 10:00 horas del día 29 de octubre del 2021, estando presente el Jurado Calificador nominado por Resolución de Facultad N°10039-2021-FACI/UNJBG (20 de octubre del 2021), conformado por los siguientes docentes:

MSc. ANGELA CHOQUE MIRANDA	PRESIDENTE
Mgr. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA	SECRETARIO
MSc. SOLEDAD BORNÁS ACOSTA	MIEMBRO

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el presidente del Jurado instó al Bachiller ALONSO ROBERTO POMA TICONA, a exponer la tesis titulada "**Caracterización enzimática de una α -amilasa producida por la bacteria termófila *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 aislada del rumen bovino**"

Siendo las 11:25 horas el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: **Aprobado por Unanimidad**, con el calificativo de **diecinueve (19)** de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 11:40 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.


PRESIDENTE


SECRETARIO


MIEMBRO

DEDICATORIA

A mi papá y mamá, Roberto y Francisca,

A mi hermana Rocio

Les dedico

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por estar siempre conmigo, por darme fuerza interior, ánimo y coraje para superar las dificultades y mostrarme el camino en las horas inciertas.

A mi asesor Dr. Daladier Castillo Cotrina, por su esfuerzo, dedicación y su motivación para poder desarrollar este trabajo.

A la Dra. Eliane Ferreira Noronha de la Universidad de Brasilia, por depositar su confianza en mí y brindarme la oportunidad de participar en su laboratorio para poder realizar los ensayos enzimáticos.

A los profesores y estudiantes del laboratorio de enzimología de la Universidad de Brasilia, por la agradable convivencia, paciencia, enseñanzas y discusiones de trabajo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Hipótesis	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo general.....	5
1.4.2. Objetivos específicos	5
1.5. Marco teórico	6
1.5.1. Almidón: Aspectos generales y su estructura	6
1.5.2. Hidrólisis enzimática del almidón	9
1.5.2.1. α -amilasas.....	11
1.5.3. Tecnología enzimática de la α -amilasa.....	14
1.5.4. Bacterias ruminales como fuente de enzimas amilasas.....	18
1.5.5. <i>Paenibacillus barengoltzii</i>	22
1.5.6. Factores que influyen en la actividad enzimática de la enzima α -amilasa	24
1.5.7. Técnicas cromatográficas para purificación de proteínas	27
1.5.8. Amplificación del gen ARNr 16S como herramienta para la identificación bacteriana.....	29

II. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Materiales	31
2.1.1. Material biológico	31
2.1.2. Reactivos	32
2.1.3. Equipos	34
2.1.4. Material de vidrio y otros	35
2.2. Diseño de la investigación y procesamiento de datos.....	36
2.3. Población y muestra.....	38
2.4. Métodos	39
2.4.1. Condiciones de cultivo y reactivación de la cepa A1_50L2.....	39
2.4.2. Caracterización microscópica de la cepa A1_50L2.....	40
2.4.3. Identificación molecular y validación de la cepa A1_50L2	41
2.4.4. Determinación de la actividad α -amilasa.....	43
2.4.4.1. Cálculo de la actividad enzimática (U)	45
2.4.4.2. Cálculo de la actividad específica (AE).....	45
2.4.4.1. Cálculo de la actividad relativa (AR)	46
2.4.5. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	46
2.4.5.1. Cálculo de proteínas totales	47
2.4.6. Curva de crecimiento de la cepa <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	48
2.4.7. Curva de inducción enzimática en medio líquido	48
2.4.8. Producción de la enzima α -amilasa	49
2.4.9. Ultrafiltración	49
2.4.10. Purificación de la enzima α -amilasa por cromatografía líquida	50
2.4.11. Caracterización enzimática de la enzima α -amilasa	51
2.4.11.1. Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE y Zimograma	51

2.4.11.2. Efecto del pH sobre la actividad α -amilasa	53
2.4.11.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad α -amilasa	53
2.4.11.4. Determinación de la estabilidad térmica de la α -amilasa	54
2.4.11.5. Efecto de iones y compuestos químicos sobre la actividad α -amilasa	54
III. RESULTADOS	56
3.1. Reactivación en medio líquido y caracterización microscópica de la cepa A1_50L2.....	56
3.2. Identificación molecular de la cepa A1_50L2 por análisis de la secuencia del gen ARNr 16S.....	58
3.3. Curva de crecimiento y producción de la enzima α -amilasa por <i>P.</i> <i>barengoltzii</i> A1_50L2 en medio líquido	61
3.4. Purificación parcial de la enzima α -amilasa por cromatografía líquida	67
3.5. Caracterización enzimática de la enzima α -amilasa	70
3.5.1. Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE y Zimograma	70
3.5.2. Efecto del cambio de pH sobre la actividad de la enzima α -amilasa	72
3.5.3. Efecto del cambio de la temperatura sobre la actividad de la enzima α - amilasa	76
3.5.4. Determinación de la estabilidad térmica de la enzima α -amilasa	80
3.5.5. Efecto de los iones metálicos y compuestos químicos sobre la actividad α -amilasa	82
IV. DISCUSIÓN	85
V. CONCLUSIONES	94
VI. RECOMENDACIONES	95
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies bacterianas encontradas en el ambiente ruminal. .	20
Tabla 2. Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos del pH y temperatura.....	37
Tabla 3. Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos de estabilidad térmica.	37
Tabla 4. Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos de iones metálicos y compuestos químicos.	38
Tabla 5. Condiciones del ensayo enzimático de α -amilasa.	44
Tabla 6. Condiciones del ensayo de cuantificación de proteínas totales.	47
Tabla 7. BLASTn de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado A1_50L2 contra secuencias depositadas en el GenBank.	60
Tabla 8. Análisis comparativo de las medias de los tratamientos de la curva de crecimiento de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.	62
Tabla 9. Análisis de varianza de un factor para la curva de crecimiento de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	63
Tabla 10. Análisis comparativo de las medias de los tratamientos de la curva de inducción enzimática de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.	64

Tabla 11. Análisis de varianza de un factor para la curva de inducción enzimática de la enzima α -amilasa de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	65
Tabla 12. Ultrafiltración del sobrenadante.	67
Tabla 13. Etapas de la purificación parcial de la α -amilasa producida por <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	70
Tabla 14. Análisis comparativo de las medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática α -amilasa frente al cambio de pH.....	73
Tabla 15. Análisis ordinario de varianza para la actividad α -amilasa frente a la variación del pH.....	74
Tabla 16. Prueba de Tukey de medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática frente al cambio de pH.	75
Tabla 17. Análisis comparativo de las medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática α -amilasa frente al cambio de la temperatura.	77
Tabla 18. Análisis ordinario de varianza para la actividad α -amilasa frente la variación de la temperatura.	78
Tabla 19. Prueba de Tukey de medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática frente al cambio de temperatura.	79
Tabla 20. Termoestabilidad de la enzima α -amilasa a 50 °C y 60 °C.....	81
Tabla 21. Efecto de iones y compuestos químicos sobre la actividad relativa de la α -amilasa.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura del almidón.....	8
Figura 2 Enzimas amilolíticas que participan en la degradación total del almidón	11
Figura 3 Conformación tridimensional de la α -amilasa.....	12
Figura 4 Esquema general de la plataforma de biorefinerías de α -amilasas.....	18
Figura 5 Principios de separación de proteínas por purificación cromatográfica..	29
Figura 6 Identificación bacteriana utilizando la secuenciación de la región ARNr 16S.....	30
Figura 7 Fotografía vista al microscopio óptico de la cepa A1_50L2.....	56
Figura 8 Microfotografía electrónica de barrido de la cepa A1_50L2	57
Figura 9 Amplificación del gen ARNr 16S de la cepa A1_50L2.....	58
Figura 10 Árbol filogenético del gen ARNr 16S de especies de Paenibacillus	61
Figura 11 Curva de crecimiento de la cepa P. barengoltzii A1_50L2	63
Figura 12 Curva de inducción enzimática de la cepa P. barengoltzii A1_50L2	66
Figura 13 Perfil cromatográfico de exclusión molecular	68
Figura 14 Perfil cromatográfico de intercambio aniónico.....	69
Figura 15 Electroforesis de las fases de purificación de la α -amilasa	71
Figura 16 Análisis de zimograma	72
Figura 17 Efecto del pH sobre la actividad α -amilasa.....	76

Figura 18 Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad α -amilasa	80
Figura 19 Análisis de la estabilidad térmica a 50 y 60°C.....	82
Figura 20 Efecto de los iones metálicos y compuestos químicos sobre la actividad relativa de la α -amilasa	84

RESUMEN

Las α -amilasas están entre las glicosil hidrolasas más empleadas en procesos biotecnológicos tales como en la industria de biocombustibles, textil, de papel, celulosa, y detergentes. Debido al incremento de estas aplicaciones, investigaciones vienen siendo realizadas en la búsqueda de nuevas α -amilasas con propiedades termoestables, tolerantes a la temperatura, pH e iones metálicos, con el fin de mejorar los procesos industriales y abaratar costos de producción.

El presente trabajo tiene como propósito estudiar las características enzimáticas de la α -amilasa de una nueva cepa A1_50L2 aislada del rumen bovino, con el fin de encontrar una potencial aplicación industrial. La cepa A1_50L2 fue reactivada en medio líquido reductor, y caracterizada morfológicamente como bacilos Gram positivos. La cepa A1_50L2 fue identificada mediante el análisis de la secuencia ARNr 16S como la especie *Paenibacillus barengoltzii*. Así, mismo, la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2 fue capaz de producir α -amilasa extracelular con una actividad máxima de $0,51 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un tiempo de 12 horas, cuando fue cultivada en medio líquido reductor utilizando almidón 1% (p/v) como fuente de carbono. La purificación de la α -amilasa, se realizó en 2 etapas cromatográficas siendo de exclusión molecular (Sephacryl S100) e intercambio aniónico (DEAE-Sepharose a pH 8,0).

Los análisis en gel de SDS-PAGE y zimograma mostraron que la enzima fue purificada parcialmente presentando un peso molecular de 66 kDa. La α -amilasa presentó actividad enzimática en un rango de pHs de 5 hasta 9, con actividad óptima a pH 6 ($0,79 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). También presentó actividad enzimática entre 40 y 70°C, con temperatura óptima a 60 °C ($0,98 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). La α -amilasa de *P. barengoltzii* presentó estabilidad térmica a 50 °C manteniendo 83% de su actividad enzimática por un periodo de 4 días. Así mismo, en los ensayos de iones metálicos, la α -amilasa mostró tener actividad enzimática que no depende del ion Ca^{2+} , un factor importante a considerarse para aplicaciones industriales.

La α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2 presentó importantes propiedades cinéticas que apuntan a una prometedora aplicación en procesos biotecnológicos como en la industria de detergentes y licuefacción de almidón.

Palabras clave: *Paenibacillus*, caracterización enzimática, α -amilasa, rumen.

ABSTRACT

The α -amylases are among the most employed glycosyl hydrolases in biotechnological processes, such as biofuel, textile, paper, cellulose, and detergent industries. Due to increase in industrial applications, investigations are being carried out in the search for new α -amylases with thermostable properties, tolerant to temperature, pH, and metallic ions, in order to improve industrial processes and lower production costs.

The present work aims to study the α -amylase enzymatic characteristics of a new A1_50L2 strain isolated from the bovine rumen, in order to find a potential industrial application. The A1_50L2 strain was reactivated in liquid media and morphologically characterized as Gram-positive bacilli. Strain A1_50L2 was identified by analysis of 16S rRNA sequence as *Paenibacillus barengoltzii*. Likewise, *P. barengoltzii* A1_50L2 strain was able to synthesize extracellular α -amylase with a maximum activity of 0.51 U.mL⁻¹ in a time of 12 hours, when cultivated in liquid media using 1% of starch (w/v), as carbon source. The enzymatic purification was carried out in two chromatographic steps: molecular exclusion (Sephacryl S100) and anion exchange (DEAE-Sepharose at pH 8.0).

Zymogram and SDS-PAGE analysis showed that α -amylase was partially purified resulting in a molecular weight of 66 kDa. The amylase presented enzymatic activity in a wide range of pH from 5 up to 9, with optimal activity at pH 6 (0,79 U.mL⁻¹). The enzyme presented enzymatic activity between 40 and 70 °C, with optimal temperature at 60 °C (0,98 U.mL⁻¹). The α -amylase from *P. barengoltzii* showed thermal stability at 50 °C, maintaining 83% of enzymatic activity for a long time of 4 days. Likewise, in metallic ions assay, α -amylase activity showed to be independent of ion Ca²⁺, an important factor to be considered for industrial applications

The α -amylase of *P. barengoltzii* A1_50L2 presented important kinetic properties that pointing for its promising application in biotechnological processes such as detergents and starch liquefaction industry.

Keywords: *Paenibacillus*, enzymatic characterization, α -amylase, rumen.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de enzimas y su uso enfocado a la sostenibilidad y calidad del medio ambiente son uno de los grandes desafíos de nuestro tiempo. Nuevas aplicaciones tecnológicas vienen siendo desarrolladas para responder a este desafío en diversos centros de investigación en el área biotecnológica. La tecnología enzimática es un subcampo de la biotecnología que ofrece nuevos procesos para desarrollar y generar productos de alto valor agregado con el uso de enzimas como biocatalizadores. Más específicamente, la atención se centra en la búsqueda de nuevas enzimas con mejores características catalíticas para cubrir los requerimientos de industrias especializadas en las áreas de biocombustibles, alimentos, papel, textil y detergentes (Li et al., 2012).

Las enzimas son biocatalizadores que disminuyen la energía de activación de las reacciones, permitiendo el aumento de la velocidad de reacción sin alterar el equilibrio de la reacción química, siendo de importancia comercial ya que presentan propiedades catalíticas con alta especificidad y eficiencia hacia determinados sustratos (Singhania et al., 2015).

En el contexto actual, las enzimas se han convertido en herramientas importantes en los procesos industriales y no solo para mejorar la calidad y cantidad del producto final, sino también para favorecer en la escala industrial a disminuir el uso de energía, agua, y aminorar la contaminación producida en los distintos procesos industriales (Nigam, 2013).

1.1. Planteamiento del problema

Existe un gran interés por la diversidad microbiana y que esta sea utilizada como fuente de enzimas para que sean aplicadas en diversos procesos industriales. Aunque la tecnología enzimática ha tratado de resolver este problema produciendo enzimas microbianas, la baja eficiencia catalítica de estas enzimas aún representa un limitante para la hidrólisis total en el proceso de degradación del almidón. Una de las posibles explicaciones para el éxito limitado en tecnología enzimática se debe al hecho de que la mayoría de las enzimas comercialmente disponibles son producidas principalmente por bacterias del género *Bacillus* y de hongos como *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*, que presentan propiedades enzimáticas limitadas como estabilidad térmica y baja resistencia a iones metálicos. De esta forma, para superar estas limitaciones existe una búsqueda constante de nuevos microorganismos como especies bacterianas que puedan producir enzimas termoestables y resistentes a compuestos químicos.

En ese sentido, la búsqueda de enzimas con mejores propiedades catalíticas a partir de comunidades microbianas naturalmente especializadas en ambientes de degradación de residuos amiláceos como es el rumen bovino ofrece una estrategia promisoría para la obtención de nuevas enzimas α -amilasas con potencial de mejor actividad enzimática, dicho esto, se propone la siguiente interrogante:

¿Qué propiedades cinéticas presenta la enzima α -amilasa producida por la bacteria termófila *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 aislada de rumen bovino?

1.2. Hipótesis

La bacteria *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 produce α -amilasa que presenta propiedades cinéticas adecuadas para su utilización en aplicaciones industriales.

1.3. Justificación

Las amilasas tienen gran importancia industrial debido a sus aplicaciones comerciales, pudiendo ser utilizadas como aditivos en diferentes procesos como en la licuefacción del almidón, industria de papel, en el diseño de telas textiles, industria cervecera, producción de jarabes, industria de detergentes y biocombustibles (Saini et al., 2017). Por esta razón, estas enzimas vienen creciendo considerablemente en el mercado mundial y se estima que llegarán a facturar hasta US\$ 1,5 billones hasta el 2021 (BBC Research, 2017).

En este contexto industrial, las α -amilasas bacterianas son preferidas sobre otras amilasas como las de origen fúngico, vegetal o animal, esto debido a su versatilidad bioquímica. Con el aumento del espectro de aplicaciones industriales, muchas investigaciones vienen siendo enfocadas en el desarrollo y búsqueda de nuevas enzimas con características deseadas como termoestabilidad y tolerancia a diferentes pHs, con el fin de

mejorar los procesos como la gelatinización del almidón, disminuir su viscosidad, acelerar reacciones catalíticas y también para disminuir riesgos de contaminación bacteriana (Prakash y Jaiswal, 2010).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar enzimáticamente la α -amilasa producida por la bacteria *P. barengoltzii* A1_50L2 aislado de rumen bovino.

1.4.2. Objetivos específicos

- Cultivar y reactivar la cepa termófila A1_50L2 en medio líquido reductor.
- Caracterizar morfológicamente la cepa A1_50L2.
- Caracterizar molecularmente con base en la secuencia de ARNr 16S la cepa A1_50L2.
- Determinar la actividad enzimática de la α -amilasa.
- Producir la enzima α -amilasa en medio líquido a partir de la cepa A1_50L2.
- Purificar la enzima α -amilasa por técnicas cromatográficas.
- Determinar el peso molecular de la enzima por electroforesis SDS-PAGE y zimograma.
- Determinar el efecto del pH, temperatura, termoestabilidad e iones metálicos sobre la actividad de la enzima α -amilasa.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Almidón: Aspectos generales y su estructura

El almidón es un polisacárido que se encuentra almacenado en orgánulos denominados cloroplastos en las hojas y amiloplastos en tubérculos, semillas y raíces para la acumulación de almidón como sustancia de reserva (Sarian et al., 2012). Este está ampliamente distribuido en diversas especies vegetales tales como leguminosas (entre 30 y 50% de su peso seco), granos de cereal (entre 40 y 50% de su peso seco), frutas inmaduras (entre 40 y 70%) y tubérculos (entre 65 y 75% de su peso seco) (Denardin y Da Silva, 2008).

El almidón cumple un rol indispensable como componente de la alimentación humana y animal, además de ser una potencial fuente de energía renovable y biodegradable, razón por la cual se comenzó con el desarrollo de la industria y su procesamiento de forma significativa desde el último siglo (Van Beilen y Li, 2002).

Almidones nativos y modificados son utilizados en industrias alimenticias, farmacéuticas, textiles y de papel, pudiendo ser aplicados en la modificación de la textura de alimentos o como agentes gelatinizantes (Souza y Oliveira, 2010).

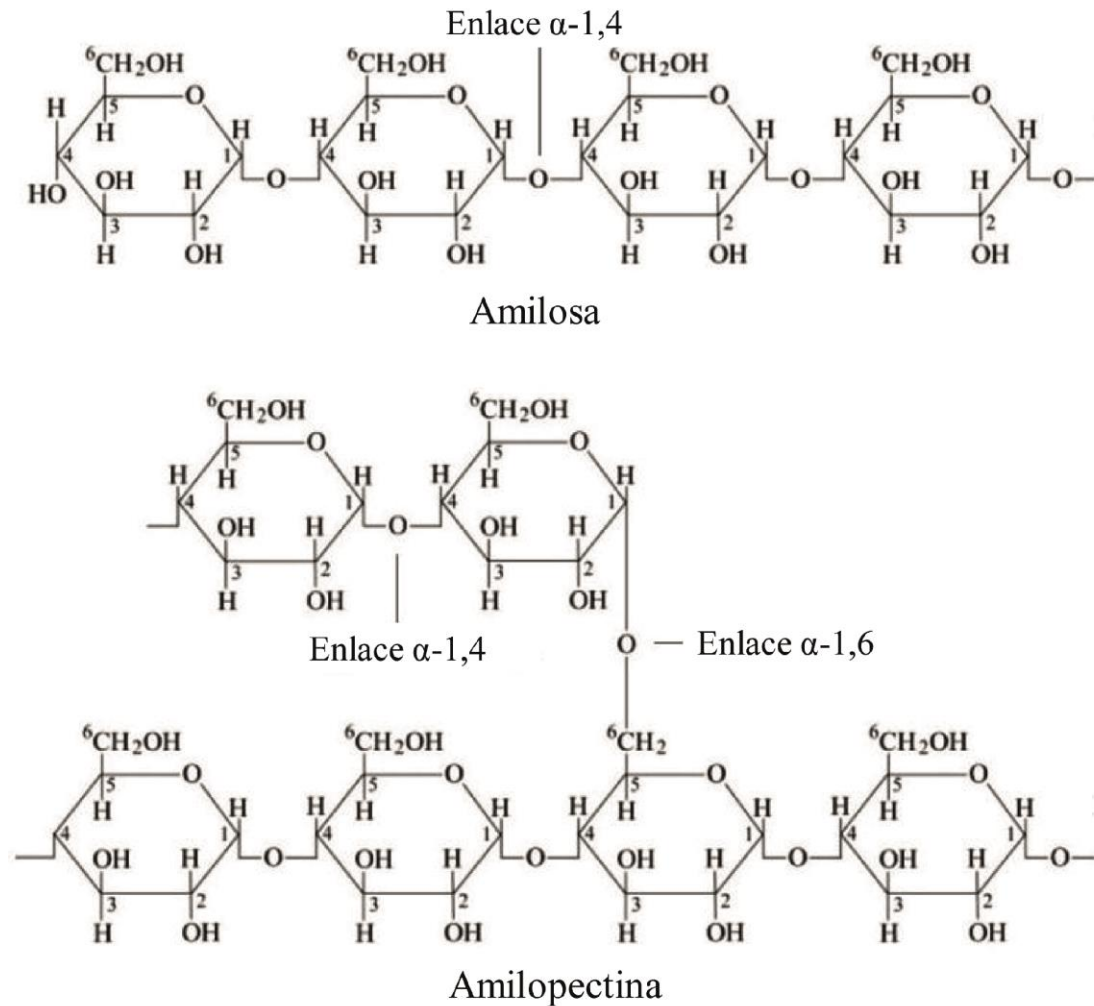
Algunas aplicaciones industriales tienen como objetivo los productos de hidrólisis de este sustrato o la propia molécula modificada. Como ejemplo, los almidones modificados, maltodextrina o ciclodextrina, hidrolizados de almidón, derivados de fructosa, jarabes de glucosa, y otros

productos de alto valor agregado como el bioetanol (a través del proceso de fermentación), siendo este último producido a mayor escala a partir de biomasa amilácea (Van der Maarel et al., 2002). La industria del almidón y la industria de sus productos derivados facturaron cerca de 72,51 billones de dólares el 2016 y las proyecciones apuntan que tal valor llegará a 106,64 billones hasta el 2022, con una tasa anual de crecimiento de 6,64% durante ese periodo (BBC Research, 2017).

Los gránulos de almidón se componen de dos clases de homopolisácaridos llamados amilosa y amilopectina (Sarian et al., 2012). La amilosa consiste en una larga cadena lineal insoluble en agua compuesto de 250 a 300 monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos de tipo α -1,4, el cual le confiere a la molécula una estructura helicoidal (Figura 1). La amilopectina consiste de cadenas lineales compuesta de 15 a 65 monómeros de D-glucosa que están unidos por enlaces del tipo α -1,4 con presencia de puntos de ramificación en enlaces del tipo α -1,6, que le confieren a esta una estructura ramificada (Bertoft, 2017).

Figura 1

Estructura del almidón



Nota. Adaptada de Physical and chemical modifications in starch structure and reactivity (p.3), por Nawaz et al. (2020), IntechOpen, 1(1).

La amilosa es responsable por la gelatinización del almidón, que es ocasionada después del calentamiento a altas temperaturas seguido por un proceso de resfriamiento. En este proceso, con el incremento de la temperatura, las moléculas de amilosa presentes en el grano de almidón

son liberadas y, una vez en solución, se reasocian entre si formando un gel (Singhania et al., 2015).

La amilopectina, considerando su estructura total, es decir tanto las cadenas lineales como las ramificaciones, es una molécula mucho mayor que la amilosa. Estas normalmente se agrupan y tienen una influencia directa en la formación regular y morfología del gránulo de almidón (Lawton, 2015). Las diferencias de proporcionalidad de la amilosa y amilopectina en la composición de las moléculas de almidón pueden variar según la fuente de la que se aisló y según las condiciones ambientales de cultivo a las que se sometió esta fuente (Wang y Copeland, 2015).

1.5.2. Hidrólisis enzimática del almidón

De acuerdo al sistema de clasificación propuesto por Henrissat y Bairoch (1993) y su implementación en el banco de datos de enzimas CAZymes (Carbohydrate-Active enzymes Database), las amilasas de forma general pertenecen a una súper familia de enzimas (llamada superfamilia de α -amilasas) que incluye glicosil hidrolasas principalmente de la familia 13. Actualmente, ya se incluyeron también a las familias 70 y 77 (Janecek et al., 2014). Estas familias abarcan una diversidad de enzimas que actúan sobre el almidón y poseen algunas características en común basadas en su mecanismo de acción, estructura y secuencia proteica, lo que implica diferentes formas de clasificación.

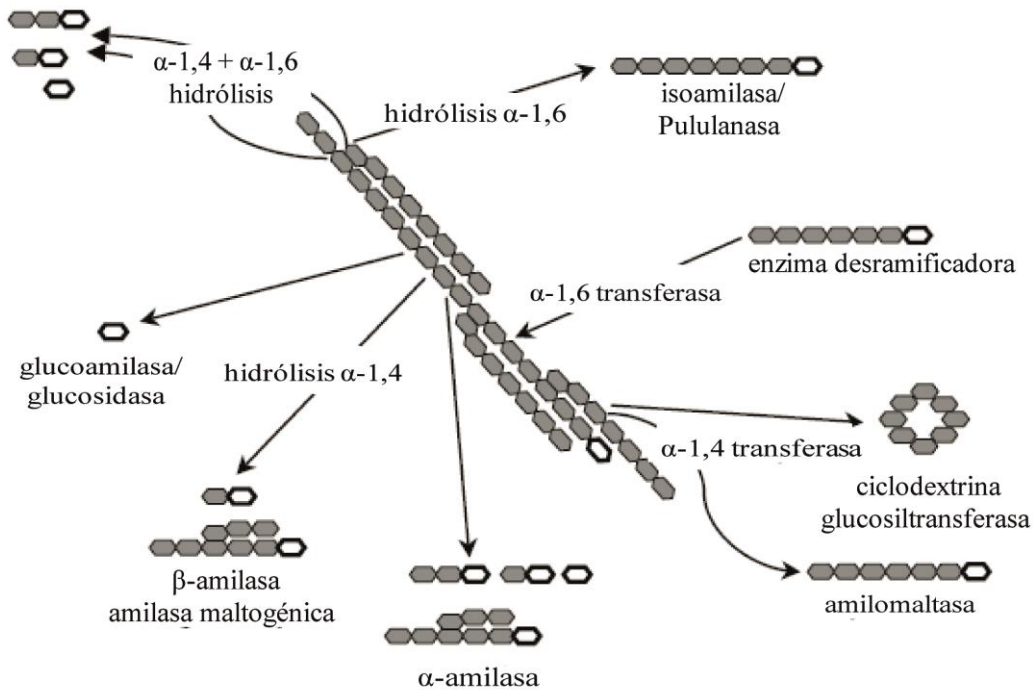
En cuanto a su mecanismo de acción, las amilasas pueden hidrolizar enlaces α -glucosídicos, produciendo mono u oligosacáridos y/o formar

enlaces del tipo α -1,4 y α -1,6 (transglucosilación). Por tanto, según el tipo de reacción que catalizan, se subdividen de forma general en 4 subclases: endoamilasas, exoamilasas, transferasas y enzimas desramificadoras (Figura 2).

Las endoamilasas conocidas como α -amilasas (EC 3.2.1.1) hidrolizan aleatoriamente los enlaces glucosídicos del tipo α -1,4 de las regiones internas de la cadena de amilosa y amilopectina, formando productos como maltosa, maltotriosa y α -dextrina límite (Negi y Vibha, 2016). Las exoamilasas conocidas como β -amilasas (EC 3.2.1.2) y glucosidasas (EC 3.2.1.20) hidrolizan los enlaces glucosídicos del tipo α -1,4 y α -1,6 de las regiones externas de la cadena de amilosa y amilopectina, formando productos de glucosa, maltosa y β -dextrina límite. Las transferasas comprenden enzimas como ciclodextrina glucosiltransferasa (EC 2.4.1.19), amilomaltasa (EC. 2.4.1.25) y α -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), las cuales pueden formar nuevos enlaces del tipo α -1,4 y/o α -1,6, adicionando nuevos monómeros en una cadena lineal o en forma de ramificaciones a lo largo de la cadena amilácea (Negi y Vibha, 2016). Las enzimas desramificadoras como las pululanases (EC 3.2.1.41) hidrolizan los enlaces glucosídicos de tipo α -1,6 de sustratos como el pululano y amilopectina, mientras que las isoamilasas (EC 3.2.1.68) hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,6 de la amilopectina formando oligosacáridos de cadena larga (Sarian et al., 2012; Sindhu et al., 2016).

Figura 2

Enzimas amilolíticas que participan en la degradación total del almidón



Nota. Adaptada de Properties and applications of starch-coverting enzymes of the alpha-amylase family (p.140), por Van der Maarel et al. (2002), Journal of Biotechnology, 94(3).

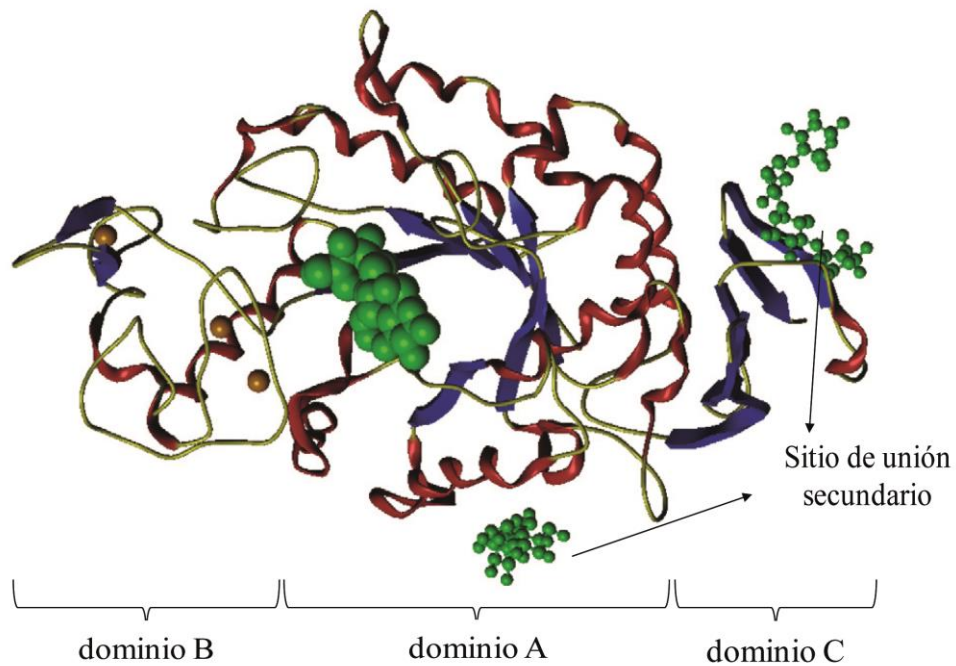
1.5.2.1. α -amilasas

Las α -amilasas pertenecen a la familia 13 de las glicosil hidrolasas (GH13) y presentan propiedades fisicoquímicas y estructurales semejantes. Las α -amilasas presentan una estructura tridimensional y conservada (Figura 3). Friedberg (1983) fue el primero en sugerir que existe una homología entre α -amilasas de diferentes orígenes. De hecho, actualmente se sabe que cuatro regiones relacionadas al sitio catalítico y al sitio de unión al sustrato son altamente conservadas entre las α -amilasas indistintamente del

origen que tengan (Prakash y Jaiswal, 2010). De tal forma, la estructura principal consiste en una cadena de polipéptidos única doblada en 3 dominios denominadas A, B y C.

Figura 3

Conformación tridimensional de la α -amilasa



Nota. Adaptada de Computer-aided subsite mapping of α -amylases (p.411), por Mótyán et al. (2011), *Carbohydrate Research*, 346(1).

El dominio catalítico A, es la estructura más conservada de todas las familias α -amilasas. Está formado de una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ N-terminal y presenta un doblamiento muy simétrico de 8 láminas- β paralelas organizadas en un barril circular por 8 α -hélices. Este barril es conocido como barril TIM, denominado así porque se reportó en un inicio en la enzima triosa fosfato isomerasa (TIM) del

músculo de la gallina presente en varias proteínas. El barril TIM posee 4 regiones conservadas y relacionadas al centro activo de la enzima. La primera región consiste de residuos de histidina dispuestos sobre la región C-terminal de la tercera lámina- β que interactúa con los monómeros de glucosa del sustrato; la siguiente región está compuesta de residuos de ácido aspártico en la cuarta lámina- β actuando como nucleófilo durante la catálisis; la tercera región consiste de residuos de ácido glutámico en la quinta lámina- β actuando como donador/aceptor de protones y la cuarta región se compone de residuos de histidina y ácido aspártico en la séptima lámina- β formándose puentes de hidrógeno con los monómeros de glucosa de los sustratos (Van der Maarel et al., 2002).

El dominio B está situado entre la tercera lámina- β y la tercera α -hélice del barril TIM. Esta es una estructura irregular y abundante en láminas- β pudiendo variar en tamaño y estructura entre las α -amilasas. El dominio B, está implicado directamente a la unión al sustrato, otorgándole flexibilidad a la molécula y se presume que puede cumplir un rol importante en la especificidad al sustrato (Prakash y Jaiswal, 2010).

El dominio C consiste en la región C-terminal y es formado por un sándwich- β antiparalelo que contiene un motivo del tipo llave griega, que ayuda a la estabilidad del dominio catalítico y en la unión con el sustrato.

Además de los dominios A, B y C, existen tipos de dominios extra, como por ejemplo los dominios D y/o E situados en la porción C-terminal, que son muy variables en la familia de las α -amilasas. El dominio D, tiene función aún desconocida, sin embargo, el dominio E está relacionado al módulo de unión al carbohidrato (CBM-carbohydrate-binding module) o dominio de unión al almidón (SBD-starch-binding domain), que podrían ayudar a mejorar la eficiencia de las enzimas amilolíticas sobre algunos tipos de almidón (Mótyán et al., 2011).

El sitio activo se sitúa en la interface entre el dominio A y el dominio B, a la altura de la región C-terminal de las láminas- β del barril TIM. A través de técnicas por difracción de rayos X se analizó la α -amilasa de *Bacillus subtilis* que estaba unida a un sustrato denominado arcabosa (pseudotetrasacárido inhibidor) descubriéndose que la zona de unión al sustrato puede acomodar de cuatro hasta diez residuos de glucosa, variando de acuerdo con el origen de la α -amilasa (Kawada et al., 2003).

1.5.3. Tecnología enzimática de la α -amilasa

Las amilasas son una de las hidrolasas más utilizadas en procesos biotecnológicos; en el mercado actual representan cerca del 65% de ventas en el mercado mundial de enzimas (BBC Research, 2017). La capacidad de hidrolizar el almidón modificando su estructura y generando productos más refinados de valor agregado, hacen que desempeñen un rol importante en

diferentes procesos industriales, por ejemplo, en la industria textil, alimentaria, detergentes, producción de papel, biocombustibles, biorremediación y farmacéutica (Prakash y Jaiswal, 2010; Singhania et al., 2015).

En la producción de biocombustibles, α -amilasas y glucoamilasas, se utilizan en la primera etapa para hidrolizar el almidón presente en la papa, yuca, bagazo, cáscaras y residuos agroindustriales, de los cuales se puede obtener productos como monosacáridos y oligosacáridos, que posteriormente son procesados por fermentación utilizando levaduras, conduciendo a la obtención de bioetanol. En el contexto actual, hay una búsqueda por fuentes alternativas a los combustibles fósiles, por consiguiente, gran parte de las aplicaciones industriales y estudios de amilasas tienen como perspectiva su aplicación en la producción de biocombustibles buscando optimizarla. De hecho, estudios de caracterización de amilasas buscan por ejemplo realizar la hidrólisis (licuefacción y sacarificación) y fermentación de forma simultánea, de esta forma buscan disminuir los costos, tiempo y gasto de energía (Li et al., 2012; Sindhu et al., 2016).

La industria de textiles y de papel utilizan las α -amilasas para el ablandamiento, modificación y en el proceso de desgomado de las fibras textiles y hojas. La goma (sustancia a base de almidón) se adiciona a estas fibras para dar una mejor resistencia e integridad a la superficie. Sin embargo, la aplicación de dicha sustancia hace que las superficies sean muy viscosas, por esta razón, las α -amilasas actúan hidrolizando los

enlaces α -1,4 del almidón de la goma. De esta forma se mejora la calidad del tejido y del papel producido. Actualmente, estos procesos comprenden α -amilasas del género *Bacillus*, tales como *Bacillus* sp. y *Bacillus licheniformis* (Haki y Rakshit, 2003; Li et al., 2012).

En la fabricación de detergentes, las α -amilasas son la segunda clase de enzimas más empleadas en la formulación de detergentes enzimáticos y dentro de estos en una gran cantidad de detergentes líquidos. Las α -amilasas actúan proporcionando una mayor capacidad para limpiar y remover manchas, mediante la degradación de residuos alimenticios que contengan almidón. Uno de los principales requisitos para ser aplicado en esta industria, es la actividad y estabilidad enzimática en ambientes oxidativos y en un rango amplio de pHs, justamente por los otros compuestos presentes en la formulación del detergente. En la actualidad se utilizan amilasas de *Aspergillus* sp. y *Bacillus subtilis*, sin embargo, nuevas amilasas están siendo descritas para su uso potencial en este sector (Singhania et al., 2015; Saini et al., 2017).

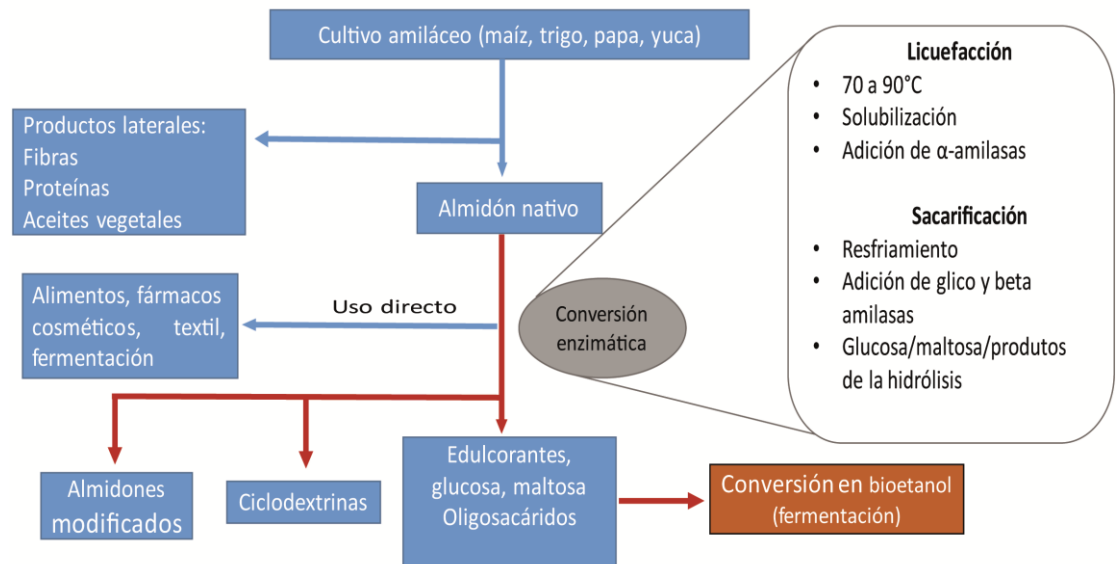
En la industria alimentaria, principalmente enfocada a la panificación, las amilasas actúan modificando o hidrolizando el almidón presente en la masa, de tal forma proporcionan los azúcares que posteriormente serán fermentados. Este proceso permite aumentar el volumen del pan y la cantidad de azúcar presente en la masa, de tal forma que las características como la viscosidad, textura y el sabor del producto final pueden ser mejoradas. En otros rubros como la industria de jugos y cerveza, estas enzimas actúan en el proceso pre-fermentativo para la generación de mono

y oligosacáridos que serán fermentados, así como en el proceso de clarificación de bebidas (Declerck et al., 2003; Saini et al., 2017).

Actualmente, las aplicaciones industriales de las amilasas mencionadas anteriormente están siendo incorporadas a los sistemas de biorefinerías (Figura 4). Las biorefinerías se consideran importantes plataformas tecnológicas para desarrollar y obtener productos de forma sustentable y eficiente. Su concepto, está enfocado a un sistema integrado de producción, el cual implementa diversas tecnologías para el procesamiento de materias primas renovables como los residuos agroindustriales, forestales y urbanos, de tal forma que estas se utilicen como una nueva materia prima transformándolos en productos de alto valor agregado. Las biorefinerías de almidón, comprenden un sistema conjunto e integrado donde procesan el almidón de diferentes fuentes utilizando una variedad de enzimas y obteniendo productos de alto valor comercial, siendo el bioetanol, glucosa, maltosa y jarabes (ricos en fructosa) los productos más obtenidos (Cherubini, 2010; Läufer, 2017; Sindhu et al., 2016).

Figura 4

Esquema general de la plataforma de biorefinerías de α -amilasas



Nota. Adaptada de Starch biorefinery enzymes, por Läufer (2017), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Netherlands: Springer.

1.5.4. Bacterias ruminales como fuente de enzimas amilasas

El rumen alberga microorganismos ruminales extremadamente diversos, comprendiendo hongos, bacterias, arqueas y protozoarios. Estos microorganismos son productores de enzimas, capaces de catalizar la hidrólisis de materiales fibrosos, amiláceos, proteínas, lípidos y azúcares en moléculas de cadenas de carbono más simples, como ácidos grasos, aminoácidos, acetato, butirato, entre otros, los cuales el animal puede absorberlos (Nagaraja, 2016).

Las bacterias, más de 200 especies, son los microorganismos predominantes en el rumen de bovinos, comprendiendo una densidad de

hasta 10^{11} células por gramo de contenido ruminal (Nagaraja, 2016). La población bacteriana en el rumen puede ser subdividida en cuatro subpoblaciones siendo: (a) una población asociada a la fracción líquida, compuesta por bacterias presentes en el líquido ruminal consumiendo componentes alimenticios solubles; (b) una población asociada a la fracción sólida, representando casi el 75% de la población microbiana ruminal, los cuales son fundamentales en la digestión de las fibras alimenticias; (c) una población de bacterias adheridas al epitelio y comprenden 1% de la población bacteriana total, estas cumplen funciones metabólicas relacionadas al hospedero; (d) una población asociada a eucariotas y es compuesta por bacterias adheridas a la superficie de protozoos y hongos. Además, estas poblaciones bacterianas también se han diversificado en relación al sustrato utilizado y al producto de fermentación generado (Tabla 1), pudiendo ser clasificadas como bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales, fermentadoras de carbohidratos no estructurales, proteolíticas lipolíticas y lácticas (Nagaraja, 2016; Puniya et al., 2015).

Tabla 1*Principales especies bacterianas encontradas en el ambiente ruminal*

Bacteria	Principales productos
Celulolíticas	
<i>Fibrobacter succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens, Clostridium lochheadii, Clostridium longisporum</i>	Succinato, acetato, formiato, lactato, H ₂ y CO ₂
Amilolíticas	
<i>Streptococcus bovis, Selenomonas ruminantium, Bacteroides ruminicola, Ruminobacter amylophilus, Succinomonas amilolitica</i>	Formiato, acetato, succinato, propionato
Lipolíticas	
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Acetato, propionato
Proteolíticas	
<i>Peptostreptococcus sp., Clostridium sticklandii, Clostridium aminophilum, Clostridium bifermentans, Ruminobacter amylophilus, Prevotella ruminicola</i>	AGCR, acetato y butirato
Pectinolíticas	
<i>Treponema saccharophilum, Lachnospira multiparus</i>	Acetato, formiato, lactato, H ₂ y CO ₂
Lácticas	
<i>Selenomonas lactilytica, Megasphaera elsdenii</i>	Acetato, succinato, propionato, butirato, H ₂ y CO ₂

Nota. AGCR = Ácidos grasos de cadena ramificada. Adaptada de Rumen Microbiology: An Overview (p.6), por Puniya et al. (2015), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, Springer, New Delhi.

Estudios de metagenómica del microbioma ruminal establecieron la presencia de por lo menos 26 filos bacterianos diferentes en el rumen bovino. Los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Fibrobacteres* son los predominantes y contribuyen significativamente en la producción de CAZymes relacionadas a la degradación de carbohidratos complejos (Neumann et al., 2018; Wang et al., 2013).

Jose et al. (2017) analizaron por metagenómica el microbioma ruminal de bovinos de raza Holstein alimentados con follaje de maíz. En este estudio se observó que el filo *Bacteroidetes* fue predominante (65% de las secuencias relacionadas al dominio Bacteria), y dentro de este filo, el género *Prevotella* (45% de las secuencias relacionadas al filo *Bacteroidetes*) fue más predominante. Se identificaron especies como *Prevotella bryantii*, *Prevotella melaninogenica* y *Prevotella ruminicola*, cuyas principales funciones en el rumen fueron atribuidas a la degradación y utilización del almidón. También se encontraron especies del género *Bacteroides* que representaron el segundo grupo predominante (42% de las secuencias relacionadas al filo *Bacteroidetes*), identificándose especies anaerobias tales como *Bacteroides amylophilus* y *Bacteroides ruminicola*, relacionadas también a la degradación de carbohidratos no estructurales como el almidón (Krause et al., 2003).

El filo *Firmicutes* es otro de los filos predominantes en el rumen y en este se encuentran una variedad de especies tanto aerobias como anaerobias, así como especies termófilas. Estas especies pueden producir un set completo de enzimas amilasas que degradan carbohidratos como las

fibras vegetales y amiláceas. Dentro de este filo se han identificado a *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellulolyticum* y *Clostridium longisporum* (Jose et al., 2017).

En estudios recientes, se reportaron gran diversidad de bacterias amilolíticas capaces de secretar enzimas hidrolíticas degradadoras de almidón siendo reportadas las familias GH13, GH75, GH65, GH77 y GH97, incluyendo α -amilasas y amilomaltasas (Jose et al., 2017; Krause et al., 2003).

En consecuencia, el rumen de herbívoros ha sido objeto para la prospección de microorganismos debido a la presencia de un microbioma bacteriano especializado en degradar carbohidratos como el almidón.

1.5.5. *Paenibacillus barengoltzii*

El género *Paenibacillus* son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, con forma de bastón, productoras de esporas y anteriormente clasificadas dentro del género *Bacillus* (grupo 3). Los resultados del trabajo de Ash et al. (1993) permitieron la reclasificación a un nuevo género *Paenibacillus*, ya que este estudio demostró la presencia de una secuencia característica para los miembros del grupo 3, en la región variable V5 del gen ARNr 16S, lo que permitió diferenciarlos filogenéticamente del género *Bacillus*.

El género *Paenibacillus* presenta más de 200 especies con genoma secuenciado, aislados de diferentes ambientes, por ejemplo, suelo, rumen,

intestino, alimentos, efluentes industriales y ambientes acuáticos (Grady et al., 2016).

La principal característica del género es la secreción de proteínas extracelulares, metabolitos secundarios y polisacáridos (Grady et al., 2016). También se caracterizan por utilizar fuentes complejas de carbohidratos como es el follaje y las hojas del maíz, cáscara de soja, bagazo de caña de azúcar, residuos amiláceos, entre otros (Dhawan et al., 2016).

Como fuente de enzimas microbianas, el género *Paenibacillus* es muy conocido como productor de enzimas hidrolíticas para aplicaciones en procesos industriales tales como, celulasas, hemicelulasas, pectinasas y amilasas (Di Marco et al., 2017).

Paenibacillus barengoltzii es una bacteria Gram-positiva de forma abastionada, formadora de endoesporas, anaerobia facultativa y moderadamente termófila perteneciente al filo *Firmicutes*. Trabajos iniciales de caracterización mostraron que *P. barengoltzii* es capaz de utilizar una variedad de fuentes de carbono, por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, seguido por disacáridos como celobiosa, maltosa, lactosa y algunos polímeros como pululano y xilana (Osman et al., 2006).

Cepas de *P. barengoltzii* ya han sido descritas, y aisladas de diferentes ambientes. La primera cepa a ser aislada fue ATCC BAA-1209 (SAFN-016), aislada de las instalaciones del laboratorio a propulsión (JPL) de la NASA en el 2006 (Osman et al., 2006). Posteriormente, cepas aisladas G22, J12 y CAU904, que ya poseen su genoma secuenciado fueron aisladas del suelo y de un ambiente marino (Fu et al., 2014). La cepa

CAU904 posee 4,7 Mpb y codifica para 4,326 genes (Liu et al., 2016). A partir de este análisis, ya se han estudiado y caracterizado siete enzimas, siendo L-asparaginasa, β -N-acetilglucosaminidasa, pulunana, xilana, β -galactosidasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa (Fu et al., 2016; Fu et al., 2014; Liu et al., 2016; Liu et al., 2018). Por tanto, a la actualidad, esta especie ha sido poco explorada con relación al uso de enzimas hidrolíticas para su aplicación industrial.

1.5.6. Factores que influyen en la actividad enzimática de la enzima α -amilasa

Las enzimas, biomoléculas altamente específicas son indispensables en la catálisis de diversas reacciones químicas celulares. Su estructura tridimensional es definida por la secuencia de aminoácidos y por las condiciones del medio físico en la que se encuentren inmersas, por ejemplo, temperatura, pH, fuerza iónica y presencia de iones metálicos. La capacidad catalítica de las enzimas dependerá, en primer lugar, del mantenimiento de las conformaciones de las estructuras terciarias o cuaternarias capaces de eficientemente promover la transformación del sustrato en productos. Alteraciones en la estructura tridimensional de las enzimas pueden inhibir o hasta eliminar totalmente su capacidad catalítica. Por tanto, factores que alteren su estructura tridimensional podrán influir sobre la modificación de su actividad enzimática (Haki y Rakshit, 2003; Sindhu et al., 2016).

Por medio de estudios de cinética enzimática es posible obtener informaciones importantes con relación al mecanismo de catálisis y las propiedades cinéticas de una determinada enzima (Bisswanger, 2014).

El aumento de la temperatura tiene dos efectos sobre la actividad enzimática: (a) se incrementa la energía cinética de las moléculas que tienen como consecuencia un mayor número de choques moleculares efectivos entre la enzima y el sustrato; y (b) un efecto sobre las fuerzas que mantienen las estructuras tridimensionales de la enzima, pudiendo ocurrir cambios inclusive hasta profundos en la conformación de la enzima, reduciendo su capacidad enzimática. En consecuencia, algunas enzimas pueden presentar mayor actividad en temperaturas más amenas, mientras que otras como las de microorganismos termófilos poseen actividad en temperaturas elevadas, esto debido a su estabilidad térmica que está íntimamente asociada a las interacciones que mantienen su estructura nativa. Por ejemplo, enzimas termófilas usualmente son estabilizadas por puentes disulfuro (Haki y Rakshit, 2003; Prakash y Jaiswal, 2010; Saini et al., 2017).

El pH tiene influencia sobre la reacción enzimática ya que: (a) pueden alterar la conformación tridimensional, principalmente por alteraciones a nivel de los puentes de hidrógeno y puentes salinos que son responsables por el mantenimiento de la estructura tridimensional; (b) pueden alterar el microambiente del sitio activo de la enzima responsable por la unión del sustrato. En consecuencia, ocurre una alteración de la carga residual de los grupos de cadenas laterales, los cuales son claves en

la unión al sustrato, así como para la catálisis enzimática (Van der Maarel et al., 2002).

Diferentes sustancias pueden alterar la actividad de una enzima, cambiándola de manera que influya en la unión al sustrato. Los iones metálicos pueden denominarse como efectores, ya que pueden actuar como activadores o inhibidores de la actividad enzimática. La unión de los metales a las enzimas juega un papel importante en su activación y estabilización (Bearne, 2014).

Se sabe que la mayoría de las α -amilasas son enzimas dependientes de iones metálicos. Una propiedad aceptada de las amilasas es su contenido de Ca^{2+} como parte integral de la molécula enzimática y su consiguiente activación por Ca^{2+} e inhibición por agentes quelantes. También, se ha informado que las amilasas son inhibidas por iones de metales pesados como Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , etc., lo que sugiere la participación de residuos de aminoácidos catalíticos en la actividad enzimática. Por ejemplo, los grupos tiol (-SH) contenidos en las regiones laterales de las unidades de cisteína ubicados en el centro activo, actúan ocasionalmente como ligando del ion Hg^{2+} y su eventual oxidación llevaría a una irregular formación de enlaces disulfuro ocasionando una probable inhibición enzimática. Así mismo, el Fe^{2+} puede formar complejos con los residuos D/L-lisina y L-metionina, el Cu^{2+} con la histidina y el Ba^{2+} con residuos de arginina, glutamina, prolina, serina y valina (Prakash et al., 2011; Sindhu et al., 2016).

Algunos compuestos químicos también pueden tener influencia sobre la actividad enzimática. Los agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), etilenglicol y DPPE (1,2-bis(difenilfosfino)etano) pueden inhibir la actividad α -amilasa, secuestrando los iones metálicos que estabilizan el sitio activo de la enzima como el ion Ca^{2+} , o los agentes surfactantes como el Tween-100, Triton X-100 y el SDS (dodecilsulfato sódico) que tienden a disminuir la tensión superficial del sistema acuoso, actuando como agentes activadores de las enzimas (Pereira et al., 2017).

1.5.7. Técnicas cromatográficas para purificación de proteínas

Las fases de purificación de proteínas son dominadas principalmente por técnicas cromatográficas líquidas, las cuales requieren diversas etapas desde la producción hasta la obtención del extracto para finalmente ser sometido a purificación. Las estrategias de purificación están principalmente basadas en las propiedades de las proteínas como el tamaño/peso, carga eléctrica, solubilidad o hidrofobicidad (Figura 5) (Mayolo-Deloisa et al., 2012).

Se denomina cromatografía de exclusión molecular o gel de filtración a las etapas de separación física de proteínas en función a su tamaño/peso molecular cuando una fase móvil (solución tampón) fluye a través de una matriz porosa. En esta técnica, las proteínas que son aplicadas a una columna conteniendo una matriz porosa, van eluyendo en función a su tamaño/peso molecular; de tal forma que, las proteínas de mayor peso molecular serán eluidas en el volumen cero (V_0), mientras que las proteínas

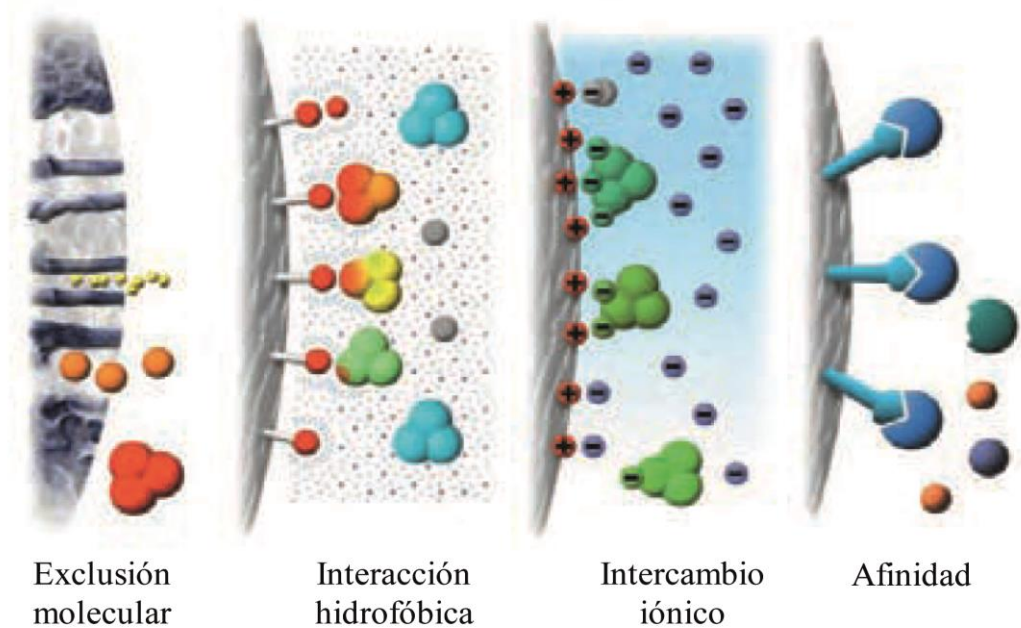
que presenten bajo peso molecular serán eluidas en el volumen de elución (V_e) (Berg et al., 2002).

Se denomina cromatografía de intercambio iónico a la técnica de separación de proteínas en función de su carga iónica total. Mediante interacciones electrostáticas, las proteínas se ligan de forma reversible a una matriz cargada positiva o negativamente y después de aplicar una fuerza iónica mediante un gradiente salino (NaCl), las proteínas van eluyendo de la columna en función de su carga neta (Mayolo-Deloisa et al., 2012).

La cromatografía de interacción hidrofóbica separa las proteínas en función de la interacción entre aminoácidos apolares de una proteína y una matriz de carácter hidrofóbico. La cromatografía por afinidad tiene como principio separar diversas proteínas basado en su afinidad hacia un ligante específico que está unido a la matriz de la columna (Berg et al., 2002).

Figura 5

Principios de separación de proteínas por purificación cromatográfica



Nota. Adaptada de Protein purification: Principles and Methods (p.7), por GE Healthcare. (2007), Handbook. Sweden: Bio-Sciences AB.

1.5.8. Amplificación del gen ARNr 16S como herramienta para la identificación bacteriana

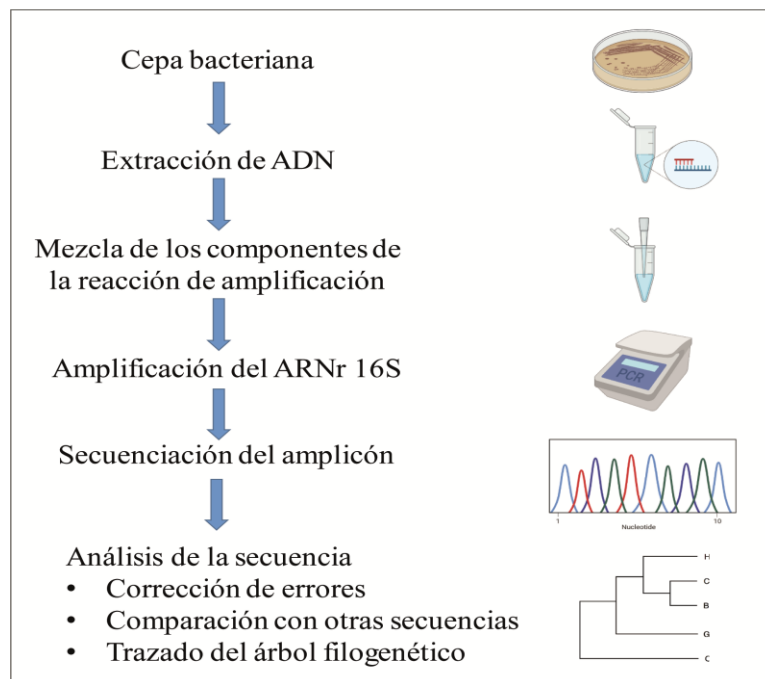
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método universal utilizado para la amplificación de material genético, por medio de una pequeña cantidad de ácidos nucleicos, se obtiene un fragmento específico de ADN de una secuencia definida. La técnica consiste en dos oligonucleótidos sintéticos y complementarios a las secuencias de las cadenas del “ADN alvo” en posiciones contrarias de los extremos del segmento a ser amplificados. Estos oligonucleótidos iniciadores, también llamados de *primers* ayudan en la iniciación de la replicación de las copias

del fragmento del “ADN alvo”. La amplificación de una secuencia de ADN por PCR, proporciona informaciones para identificar un microorganismo de interés, identificándolo dentro de una especie o género conocido (Garibyan y Avashia, 2013; Yamamoto y Harayama, 1995).

La utilización de la región 16S en la identificación bacteriana (Figura 6), se basa en la existencia de secuencias conservadas en los genes del ADN de la unidad más pequeña de los ribosomas, llamado ARNr 16S. Esta molécula se encuentra en todas las bacterias y es un patrón universal para la identificación y clasificación bacteriana (Hongoh et al., 2003).

Figura 6

Identificación bacteriana utilizando la secuenciación de la región ARNr 16S



Nota. Adaptada de Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S (p.241), por Rodicio y Mendoza (2013), *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material biológico

Para la ejecución de la presente tesis, fue utilizada la cepa termófila *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2, la cual fue aislada a partir de una muestra de líquido ruminal de un bovino de raza Holstein (*Bos taurus*). Esta cepa es parte de la colección de bacterias ruminales del laboratorio de Enzimología de la Universidad de Brasilia (UnB) bajo la supervisión de la profesora Dra. Eliane Ferreira Noronha. La autorización de uso de la cepa se detalla en el ANEXO 1.

2.1.2. Reactivos

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS ($C_7H_4N_2O_7$)
- Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$)
- Ácido acético (CH_3COOH)
- Acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$)
- Acetona (C_3H_6O)
- Albúmina de suero bovino (ASB)
- Almidón soluble ($C_6H_{10}O_5$)_n
- Aceite de inmersión (SIGMA)
- Agarosa (SIGMA)
- Acrilamida (C_3H_5NO)
- Agua ultra pura (H_2O)
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
- Bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$)
- Cacodilato de sodio ($C_2H_6AsNaO_2$)
- Citrato de sodio ($C_4H_5Na_3O_7$)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- Cloruro de manganeso ($MnCl_2$)
- Cloruro de hierro ($FeCl_3$)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de zinc ($ZnCl_2$)
- Cloruro de cobre ($CuCl_2$)
- Cloruro de cobalto ($CoCl_2$)
- Cloruro de calcio ($CaCl_2$)
- Cloruro de mercurio ($HgCl_2$)
- Cloruro de amonio (NH_4Cl)
- Cisteína ($C_3H_7NO_2S$)

- Ditioneitol, DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$)
- Dodecilsulfato sódico, SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)
- Etanol (C_2H_5OH)
- Extracto de levadura (SIGMA)
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Fosfato de sodio (NaH_2PO_4)
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)
- Formaldehído (CH_2O)
- Gas nitrógeno (N_2)
- Glutaraldehído ($C_5H_8O_2$)
- Glicina ($C_2H_5NO_2$)
- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)
- Hidróxido de sodio ($NaOH$)
- Nitrato de plata ($AgNO_3$)
- N,N'-metileno-bis-acrilamida ($(H_2C=CHCONH)_2CH_2$)
- Poliacrilamida ($(C_3H_5NO)_n$)
- Resazurim 0,1% ($C_{12}H_7NO_4$)
- Solución Quick Start-Bradford (BIO-RAD)
- Solución de yoduro de potasio 0,1 % (KI)
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)
- Sulfito de sodio nonahidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$)
- Tetróxido de ósmio (OsO_4)
- Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$)
- Taq ADN polimerasa
- Tritón X-100 ($(C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$)

2.1.3. Equipos

- Autoclave (LABTRON Modelo LVA-C11)
- Centrífuga (KETTICH Modelo Mikro 200 R)
- Liofilizador (VIKUMER Modelo LGJ)
- Ultrafreezer (SANYO Modelo MDF-U54VC)
- Sistema de electroforesis (BIO-RAD Modelo Min-Sub)
- Termociclador (BIO-RAD Modelo MyCycler)
- Potenciómetro (KASVI Modelo K39-1014B)
- Incubadora (HETTCUBE Modelo 200R)
- Estufa (FANEM Modelo 515/2)
- Cámara de bioseguridad (TROX Modelo FLH-K)
- Espectrofotómetro (SPECTRAMAX Modelo Plus 384)
- Sistema de ultrafiltración (AMICON Modelo 8050)
- Microscopio óptico (KASVI Modelo K220)
- Set de pipetas (Gilson)
- Equipo cromatográfico AKTA (GE Healthcare)
- Transiluminador UV (KASVI Modelo K33-312A)
- Baño María (SOLAB Modelo SL-154)
- Balanza analítica (GEHAKA Modelo AG200)
- Exaustor de gas (PROLAB Modelo IN-60)

2.1.4. Material de vidrio y otros

- Matraces erlenmeyer de 250 mL
- Microtubos eppendorf de 1 mL
- Frascos de suero de 100 mL
- Vasos precipitados de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Probeta de 50 y 250 mL
- Tubos de ensayo de 5mL
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Puntas de 0,1-1,0 μ L
- Puntas de 1-20 μ L
- Puntas de 10 -200 μ L
- Puntas de 1000 μ L
- Gradillas para tubos de 15 mL
- Papel aluminio
- Tijeras
- Cinta Masking y parafilm
- Gasa y algodón
- Espátulas
- Alcohol
- Roceadores
- Marcadores negros
- Guantes de nitrilo de Talla M
- Guantes de látex de Talla M
- Tubos de plástico (Falcon) de 50 mL
- Barra agitadora magnética
- Varilla magnética
- Asa de Loop para sistema AKTA
- Jeringas de 1 y 5 mL
- Filtros Millipore de 0,25 μ m
- Pinzas metálicas

2.2. Diseño de la investigación y procesamiento de datos

En la presente tesis se desarrolló un tipo de investigación básica. Los ensayos experimentales se efectuaron en triplicado y se tomaron los valores medios, así mismo, los análisis estadísticos de los datos obtenidos se llevaron a cabo utilizándose el programa SigmaPlot v.12 (Systat Software Inc, USA) que incluyeron análisis ordinario de varianza (ANOVA) con significancia estadística igual a $p < 0,05$ para determinar si existe diferencias significativas entre los tratamientos, para ello se realizó el siguiente contraste de hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \quad \text{vs} \quad H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Es decir, contrastamos que no hay diferencias en las medias de los tratamientos frente a la alternativa (H_1) de que al menos la media de un tratamiento difiere de los demás.

Para determinar el efecto del pH y temperatura sobre la actividad α -amilasa, por hallazgo de un promedio mayor con diferencia estadísticamente significativa, se utilizó un análisis de varianza ordinario (ANOVA) y la prueba de Tukey para generar comparaciones múltiples entre las medias de los tratamientos.

Tabla 2

Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos del pH y temperatura

Factores	Valor mínimo	Valor máximo	Nivel	Unidad
pH	3	10	8	pH
Temperatura	30	75	9	°C

Para determinar la estabilidad térmica sobre la actividad α -amilasa, por hallazgo de un promedio mayor con diferencia estadísticamente significativa, se utilizó análisis de varianza ordinario (ANOVA).

Tabla 3

Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos de estabilidad térmica

Factores	Valor mínimo	Valor máximo	Nivel	Unidad
Temperatura	50	60	2	°C
Tiempo	6	96	5	Horas

Para determinar el efecto de los iones metálicos y compuestos químicos en la actividad enzimática de la α -amilasa, incluyeron análisis de varianza ordinario (ANOVA).

Tabla 4

Esquema de los valores de entrada del ANOVA para la comparación de las medias de los tratamientos de iones metálicos y compuestos químicos

Factores	Valor mínimo	Valor máximo	Nivel	Unidad
Compuesto	1	14	14	ion
Concentración	1	10	2	mM

2.3. Población y muestra

2.3.1. Población

La componen los 46 aislados bacterianos obtenidos de una muestra ruminal y que forman parte de la colección de bacterias ruminales del Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Brasilia (Anexo 2). De estas, la cepa bacteriana *P. barengoltzii* A1_50L2 fue seleccionada previamente por el equipo de trabajo del laboratorio de enzimología de la UnB por su capacidad amilolítica y fue utilizada en esta tesis para su estudio.

2.3.2. Muestra

La investigación es un trabajo descriptivo que no presenta técnica de muestreo, así que no se estableció una muestra estadística. Por tanto, en el presente estudio la muestra quedó representada solamente por la cepa bacteriana *P. barengoltzii* A1_50L2 previamente aislada y que presentó actividad α -amilasa.

2.4. Métodos

2.4.1. Condiciones de cultivo y reactivación de la cepa A1_50L2

El *stock* de la cepa A1_50L2 fue mantenida en frascos conteniendo medio líquido reductor bajo refrigeración (4 °C) y también en ultrafreezer (-80 °C) con el fin de preservar la cepa (Anexo 3).

El medio líquido reductor fue preparado de acuerdo al protocolo descrito por Hamann et al. (2015) el cual contiene 1,5g/L de KH_2PO_4 , 2,5g/L de Na_2HPO_4 , 0,5g/L de NH_4Cl , 0,5g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5g/L de NaHCO_3 , 0,09g/L de MgCl_2 , 5,0 mL/L de solución de minerales, 0,5 mL/L de solución de vitaminas, 200 mL de NaOH (0,2M), 3g/L de extracto de levadura, 0,1 % (p/v) de resazurin y 1% (p/v) de sustrato como fuente de carbono. La condición anaerobia del medio líquido fue obtenida por la adición de agentes reductores como cisteína ($0,125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y sulfito de sodio ($0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), así como la inyección de gas nitrógeno. Después de la preparación de los medios de cultivo estos fueron autoclavados por 30 minutos a una temperatura de 121 °C.

En esta etapa se realizó la reactivación y propagación de la cepa A1_50L2. El primer cultivo se realizó inoculando 500 μL ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,2$) del *stock* de la cepa A1_50L2 en un frasco conteniendo 100 mL de medio líquido reductor en atmósfera anaeróbica y

suplementado con 1% (p/v) de almidón soluble como única fuente de carbono y seguidamente el medio fue incubado a 55°C por 2 días.

2.4.2. Caracterización microscópica de la cepa A1_50L2

La cepa bacteriana reactivada fue caracterizada microscópicamente, para lo cual se efectuó la tinción Gram de acuerdo al protocolo descrito por Smith y Hussey (2005), registrándose su coloración y morfología por observación en el microscopio óptico utilizando aceite de inmersión con aumento de 1000X.

Adicionalmente, las células bacterianas de la cepa A1_50L2 fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) en el Laboratorio de Microscopía y Microanálisis (LMM) de la Universidad de Brasilia.

La preparación de la muestra se realizó siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio (Laboratorio de Microscopía y Microanálisis, 2020), con las siguientes etapas: a) Fijación con aldehído: fue usado la solución fijadora Karnovsky (glutaraldehído 2,5% (v/v), formaldehído 2,5% en tampón cacodilato de sodio 0,05 M, CaCl₂ 0,001M, pH 7,2). El pellet celular fue sumergido en esta solución durante 5 horas a 4°C. Después de la fijación, la muestra fue lavada 3 veces con solución tampón cacodilato 0,05 M pH 7,2 y enseguida la muestra se sumergió en solución de tetróxido de ósmio (OsO₄ al 1%) a temperatura ambiente por 1 hora; b) deshidratación,

después de la fijación en OsO₄ la muestra fue lavada con agua destilada y seguidamente pasaron por concentraciones crecientes de etanol (10, 25, 50, 75, 95 y 100%) permaneciendo 10 minutos en cada una; c) secado: después de pasar por la solución al 100% la muestra fue llevada para secado de punto crítico usando el equipo CPD 030-Balzers y enseguida, d) la muestra fue fijada a pequeñas placas de aluminio (stubs) y metalizadas con oro usando el equipo Sputter Coater 050-Balzers, para posteriormente ser visualizado en el microscopio electrónico de barrido JSM-7000F (Jeol, Japan).

2.4.3. Identificación molecular y validación de la cepa A1_50L2

Para efectos de este trabajo y garantizar la pureza de la cepa A1_50L2, se realizó la validación molecular con base en el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S.

Para la obtención del ADN genómico, inicialmente la cepa A1_50L2 fue inoculada en 100 mL de medio líquido reductor bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 2.4.1, siendo suplementado con 1% (p/v) de almidón como fuente de carbono e incubado a 55 °C por dos días. Después de la incubación, el caldo de cultivo fue centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C (Di Marco et al., 2017).

Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y el pellet celular formado fue resuspendido en 50 mL de solución tamponante TE (Tris pH 8,0 10 Mm y 1 mM de EDTA) y entonces se

procedió a la extracción y purificación de ADN, utilizándose un kit comercial para purificación de ADN genómico (Wizard® genomic DNA purification kit A1120, Promega, USA). La metodología de extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo del kit.

La amplificación de la secuencia de ARNr 16S se realizó utilizando los primers universales 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1387R (5'-GGGCGGWGTGTA CAAGGC-3'). La reacción de amplificación estuvo compuesta de: 20 ng de ADN genómico, 2,5 µL de tampón 10X (Phoneutria, Brasil), 2,0 mM de MgCl₂, 1U de Taq ADN polimerasa (Phoneutria, Brasil), 10 µM de primer reverso y forward para un volumen total de 25 µL. Los parámetros de temperatura y ciclos del PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, anillamiento a 51°C por 1 minuto y 30 segundos, extensión a 72°C por 2 minutos y extensión final de 72°C.

El ADN amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). El producto de PCR presentó 1300 pares de bases (pb) y fue purificado a partir del gel de agarosa usando el kit de purificación GeneJET PCR (Thermo fisher, USA) y entonces fue secuenciado por el método de Sanger (Macrogen Inc. Korea).

El análisis de datos de la secuencia fue realizado mediante el programa Geneious v.5.11.1.2 (Geneious, 2020). Se realizó el trimado de la secuencia usando un índice de calidad Phred.

Enseguida, la secuencia fue sometida a consulta de similaridad de nucleótidos con secuencias ARNr 16S de la base de datos Genbank (Benson et al., 2012) usando el algoritmo BLASTn (Madden, 2013). Múltiples alineamientos de secuencias del género *Paenibacillus* (similitudes mayores a 95%) se analizaron en el programa MUSCLE v. 3.8.31 (Edgar, 2004), usando secuencias ARNr 16S de cepas de diferentes ambientes como suelo, fluentes industriales, sedimento marino y rumen que fueron extraídos del Genbank.

La construcción del árbol filogenético se realizó usando el programa FastTree v.2.1 con parámetros predeterminados por el programa (Price et al., 2010). La secuencia de la región ARNr 16S de *P. barengoltzii* A1_50L2 fue depositada en el banco de datos del Genbank con N° de acceso MK243683.

2.4.4. Determinación de la actividad α -amilasa

Las muestras enzimáticas fueron cuantificadas de acuerdo con su actividad α -amilasa. Para esto, se realizaron ensayos enzimáticos siguiendo el método descrito por Fuwa (1954), donde 100 μ L de la muestra fue mezclada con 100 μ L de 1% de almidón soluble preparado en una solución tamponante (100 mM de citrato de sodio a pH 5,0), entonces el ensayo fue incubado a 50 °C por 15 minutos. Después, la reacción enzimática fue interrumpida adicionando 200 μ L de ácido acético 1M, seguidamente, al ensayo se agregó 9,4 mL de agua destilada y 200 μ L solución Fuwa (KI 0,1% p/v). La lectura

de absorbancia se realizó a 620 nm. El mismo método se realizó utilizando 60 μL de agua destilada en vez de la muestra enzimática, esto para medir la absorbancia en ausencia de la enzima utilizándose este como control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 5

Condiciones del ensayo enzimático de α -amilasa

Ensayo	Enzima (μl)	Almidón 1% (μL)	Ácido acético (μL)	H ₂ O destil. (mL)	Solución Fuwa (μL)
Control	H ₂ O	100	200	9,4	200
1	100	100	200	9,4	200
2	100	100	200	9,4	200
3	100	100	200	9,4	200

Para cuantificar el almidón consumido en la reacción enzimática, se tuvo que construir una curva de calibración, para esto se prepararon diluciones de almidón en las concentraciones de 0,2 hasta 2,0 mg.mL^{-1} . La ecuación de regresión lineal ($y = ax + b$) que se generó de la curva de calibración tuvo un $R^2 \geq 0,99$, donde “y” es el valor de la absorbancia y “x” es la cantidad (mg) de almidón consumido (Anexo 4).

2.4.4.1. Cálculo de la actividad enzimática (U)

El cálculo de la actividad enzimática (U) se realizó utilizando la fórmula siguiente:

$$U = \frac{Ac \times Vt \times f}{Ti \times V}$$

Donde:

Ac es la cantidad de almidón consumido en la reacción enzimática y se expresa en miligramos; **Vt** es el volumen total del ensayo enzimática expresado en mililitros; **f** es el factor de dilución; **Ti** es el tiempo de reacción enzimática expresado en minutos y **V** es el volumen de la muestra enzimática expresado en mililitros.

La actividad enzimática se expresó en U.mL⁻¹ de solución enzimática, siendo que una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 mg de almidón por minuto de reacción.

2.4.4.2. Cálculo de la actividad específica (AE)

Se calculó la actividad específica por la división entre la actividad enzimática (U) y la proteína total (mg) presente en la reacción:

$$AE \text{ (U/mg)} = \frac{\text{Actividad enzimática (U)}}{\text{mg de proteína total}}$$

2.4.4.1. Cálculo de la actividad relativa (AR)

El cálculo de la actividad relativa se realizó utilizando la fórmula siguiente:

$$AR (\%) = \frac{U_m \times 100\%}{U_c}$$

Donde:

Um es la actividad enzimática (U) del ensayo a evaluar y **Uc** es la actividad enzimática de la muestra control.

2.4.5. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

El ensayo para la determinación de proteínas totales se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Bradford (1976), en el cual 150 µL de la muestra enzimática fue mezclada con 150 µL del reactivo Bradford de la marca Quick Start™ (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El ensayo se incubó a temperatura ambiente por un tiempo de 10 minutos y enseguida se efectuó la lectura de absorbancia a 595 nm. El mismo ensayo se realizó utilizando 150 µL de agua destilada en vez de la muestra enzimática, esto para medir la absorbancia en ausencia de la enzima utilizándose este como control. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado (Tabla 6).

Tabla 6

Condiciones del ensayo de cuantificación de proteínas totales

Ensayo	Enzima (μL)	Solución Bradford (μL)
Control	H ₂ O	150
1	150	150
2	150	150
3	150	150

Para cuantificar el contenido de proteínas totales en la muestra enzimática, se tuvo que construir una curva de calibración, para esto se prepararon diluciones de la proteína ASB (albúmina de suero bovino) en las concentraciones de 1 a 4 μg . La ecuación de regresión lineal ($y = ax + b$) que se generó de la curva de calibración tuvo un $R^2 \geq 0,99$, donde “**y**” es el valor de la absorbancia y “**x**” es la cantidad de proteína (μg) en 150 μL de la reacción (Anexo 5).

2.4.5.1. Cálculo de proteínas totales

Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína total } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\mu\text{g de proteína detectada} \times 1000 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}}$$

2.4.6. Curva de crecimiento de la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2

La curva de crecimiento bacteriano se analizó preparando 3 frascos conteniendo 100 mL de medio líquido reductor anaeróbico conforme descrito en la sección 2.4.1 y se suplementó con 1% (p/v) de almidón como fuente de carbono. Enseguida 3 mL del pre-inóculo de la cepa A1_50L2 ($O.D_{600nm}=0,1$) fueron inoculados en cada frasco y llevados a incubación a 55°C por 2 días. Enseguida, alícuotas de 5 mL fueron extraídas de los medios de cultivo cada 12 horas hasta los dos días de crecimiento y la curva de crecimiento se evaluó midiéndose la densidad óptica (O.D) a 600 nm. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

2.4.7. Curva de inducción enzimática en medio líquido

Con el fin de evaluar la secreción de la enzima α -amilasa por la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2 se realizaron cultivos de 48 horas. Para esto, se inoculó la cepa A1_50L2 del pre-inóculo (3mL $OD_{600nm}=0,1$) en 3 frascos conteniendo 100 mL de medio líquido reductor suplementado con 1% (p/v) de almidón como fuente de carbono. Los frascos inoculados fueron incubados a 55°C y alícuotas de 5 mL fueron extraídas de los medios de cultivo a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas de crecimiento. Estas alícuotas fueron centrifugadas a 10000 x g a 4°C por 10 minutos, y seguidamente, de los sobrenadantes obtenidos se realizaron ensayos de actividad α -

amilasa para determinar el perfil de secreción enzimática de *P. barengoltzii* A1_50L2.

2.4.8. Producción de la enzima α -amilasa

Después del análisis de la curva de inducción enzimática de la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2, se determinó el mejor tiempo de secreción enzimática y entonces se procedió a la producción de la α -amilasa para su utilización en los experimentos siguientes de purificación y caracterización enzimática.

Para esto, la cepa A1_50L2 fue inoculada (3mL O.D_{600nm}=0,1) en 5 frascos conteniendo 100 mL de medio líquido reductor suplementado con 1% (p/v) de almidón y fueron incubados a 55°C. Después de 12 horas de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 10000 x g a 4°C por 10 minutos y los sobrenadantes enzimáticos fueron juntados (500 mL) constituyendo una sola muestra enzimática y se refrigeró a 4°C.

2.4.9. Ultrafiltración

Previo a la purificación de la α -amilasa producida por *P. barengoltzii*, la muestra enzimática fue ultrafiltrada utilizando el método descrito por Osiro (2015). Para esto, el sobrenadante enzimático (500 mL) fue concentrado 10 veces en un frasco agitado Amicon® a 2.5 kgf cm⁻² a temperatura ambiente, siendo utilizada una

membrana con un rango de exclusión de 10 kDa (Millipore Co., USA).

Finalmente, la muestra enzimática concentrada fue dializada (12 kDa cut-off) en agua destilada a 4°C durante 12 horas y después se guardó a 4°C hasta su uso. El concentrado enzimático dializado fue usado para ensayos de purificación enzimática por cromatografía líquida.

2.4.10. Purificación de la enzima α -amilasa por cromatografía líquida

Las fases de purificación se ejecutaron utilizando un equipo de cromatografía líquida automatizada AKTA purifier (GE, Sweden). Las corridas cromatográficas fueron monitoreadas por lectura de absorbancia de UV a 295 nm y los datos se obtuvieron y procesaron a través del programa Unicorn 5.1 integrado al equipo de cromatografía AKTA purifier.

En una primera etapa, se inyectó 5 mL de la muestra enzimática concentrada a la columna cromatográfica de exclusión molecular con matriz Sephacryl S100 (2,0 x 68,2 cm) teniendo como fase móvil una solución tampón (50 mM de Tris-HCl a pH 8,0) con 0,15 M de cloruro de sodio. Fracciones proteicas de 3 mL se eluyeron de la columna con un flujo continuo de 20 mL/h. Se realizaron ensayos enzimáticos para la detección de α -amilasa con el fin de evaluar el perfil de separación/elución de la enzima.

Las fracciones cromatográficas con actividad α -amilasa fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y sometidas a una nueva cromatografía del tipo intercambio aniónico.

Entonces en la segunda etapa, se inyectó 5 mL de la muestra enzimática (proveniente de la primera cromatografía) a una columna cromatográfica de intercambio aniónico con matriz HiTrap DEAE-FF Sepharose (GE Healthcare). La elución de proteínas se realizó mediante un flujo continuo de 1,0 mL por minuto y a una presión constante de 0,3 MPa, teniendo como fase móvil una solución tampón de 50 mM de Tris-HCl a pH 8,0, con la adición posterior de un gradiente lineal salino (0,1 - 1 M de NaCl) para finalmente ser recolectado 2 mL por fracción. Las fracciones con actividad α -amilasa fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE y después se dializaron contra agua destilada y se almacenaron a 4°C para su estudio de caracterización enzimática.

2.4.11. Caracterización enzimática de la enzima α -amilasa

2.4.11.1. Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE y

Zimograma

Para evaluar el grado de pureza de la enzima α -amilasa, proteínas de las fracciones cromatográficas (1 mL) fueron precipitadas utilizándose ácido tricloroacético al 10% (v/v) de concentración final. Después de 1 hora de incubación

a 4 °C, la muestra fue centrifugada a 10000 x g a 4 °C por 15 minutos, el sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado utilizándose acetona helada mediante centrifugación con las mismas condiciones descritas anteriormente (Blume et al., 2013).

La enzima precipitada (30 µg) se analizó por electroforesis de proteínas en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (v/v) como describe Laemmli (1970). Posterior a la corrida electroforética se hizo la tinción del gel para la visualización de la banda proteica utilizándose una solución de 0,1% (p/v) de nitrato de plata (Blum et al., 1987). El kit, Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific, USA) fue utilizado como marcador de peso molecular de proteínas.

Para el análisis por zimograma se realizó usando un gel desnaturizante como se describió para SDS-PAGE, con la excepción que al momento de la polimerización se añadió a la matriz una solución de almidón en una concentración final de 1% (p/v). El gel resultante se sumergió en 50 mL de solución Tritón X-100 (2,5% p/v) por 15 minutos para provocar la renaturalización de la enzima. Enseguida, el gel fue sumergido en 50 mL de solución tamponante de fosfato de sodio (50 mM a pH 6,0) y se dejó incubando a 50°C. Después de 1 hora de incubación, se realizó la tinción con solución Fuwa (KI 0,1%

p/v) por 5 minutos para visualizar una banda clara de hidrólisis que representó la actividad α -amilasa en el gel.

2.4.11.2. Efecto del pH sobre la actividad α -amilasa

Los ensayos enzimáticos del pH se ejecutaron siguiendo la metodología de la determinación de la actividad α -amilasa descrita en la sección 2.4.4, variando apenas los valores de pH de 3 a 10 en los ensayos enzimáticos. Fueron utilizados los tampones siguientes: 100 mM de solución citrato de sodio a pHs 3,0; 4,0 y 5,0; 100 mM de solución fosfato de sodio a pHs 6,0 y 7,0; 100 mM de solución Tris-HCl a pHs 8,0 y 9,0 y 100 mM de solución de bicarbonato de sodio a pH 10. Todos los ensayos se hicieron en triplicado.

2.4.11.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad α -amilasa

Los ensayos enzimáticos de la temperatura se ejecutaron variando los valores de la temperatura de 30 a 75 °C en los ensayos enzimáticos y se tamponaron con 100 mM de solución fosfato de sodio a pH 6,0. Los ensayos enzimáticos se realizaron siguiendo la metodología para la determinación de la actividad α -amilasa descrito previamente en la sección 2.4.4. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

2.4.11.4. Determinación de la estabilidad térmica de la α -amilasa

La muestra enzimática purificada fue incubada a 50 y 60 °C para evaluar la estabilidad de la actividad α -amilasa a lo largo del tiempo. Cada 24 horas se retiraron alícuotas de 500 μ L y se repitió este procedimiento por un periodo de 4 días. Los ensayos enzimáticos de cada una de las alícuotas se ejecutaron siguiendo el procedimiento mencionado en la sección 2.4.4. También se realizaron ensayos enzimáticos de una muestra fresca de la enzima pura (enzima sin incubar) y estos fueron evaluados y considerados como 100% de la actividad enzimática.

2.4.11.5. Efecto de iones y compuestos químicos sobre la actividad α -amilasa

Se investigó el efecto de los iones metálicos (Mg^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Hg^{2+}), así como algunos compuestos químicos (EDTA, β -mercaptoetanol, DTT y SDS) sobre la actividad enzimática α -amilasa. Basado en la literatura actual sobre enzimas amilasas involucradas en diferentes aplicaciones industriales como detergentes, industria textil, biorefinerías, entre otros, se seleccionaron estos iones y se realizaron los ensayos enzimáticos correspondientes (Saini et al., 2017; Silva et al., 2019).

La muestra enzimática purificada fue alicuotada y pre-incubada a temperatura ambiente por 1 hora en presencia de estos iones metálicos en las concentraciones finales de 1mM y 10mM (Moreira et al., 2013). Como ensayo control, se sustituyó el volumen de los compuestos iónicos por agua destilada. Después de la pre-incubación, se realizaron los ensayos para determinar la actividad α -amilasa como está descrito en la sección 2.4.4, y los valores de actividad enzimática fueron expresados como actividad relativa, considerando 100% de la actividad enzimática al ensayo control. Todos los ensayos enzimáticos se hicieron en triplicado.

III. RESULTADOS

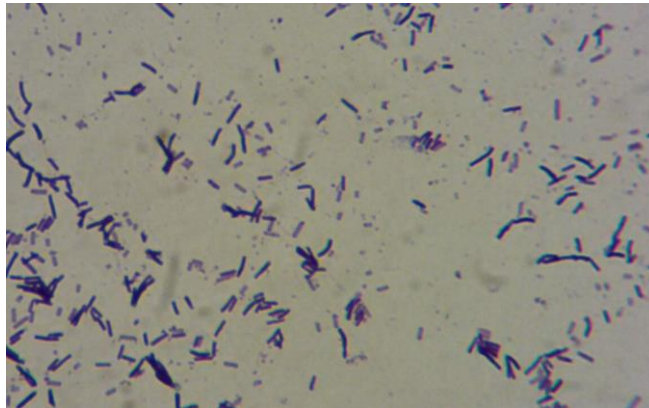
3.1. Reactivación en medio líquido y caracterización microscópica de la cepa A1_50L2

La reactivación de la cepa A1_50L2 se realizó en medio líquido reductor suplementado con almidón al 1% (p/v) a la temperatura de 55 °C por 2 días de incubación.

Las características microscópicas observadas de la cepa reactivada A1_50L2 se muestran en la Figura 7. Se observaron bacterias Gram positivas y su morfología correspondió a formas bacilares de diferentes longitudes.

Figura 7

Fotografía vista al microscopio óptico de la cepa A1_50L2



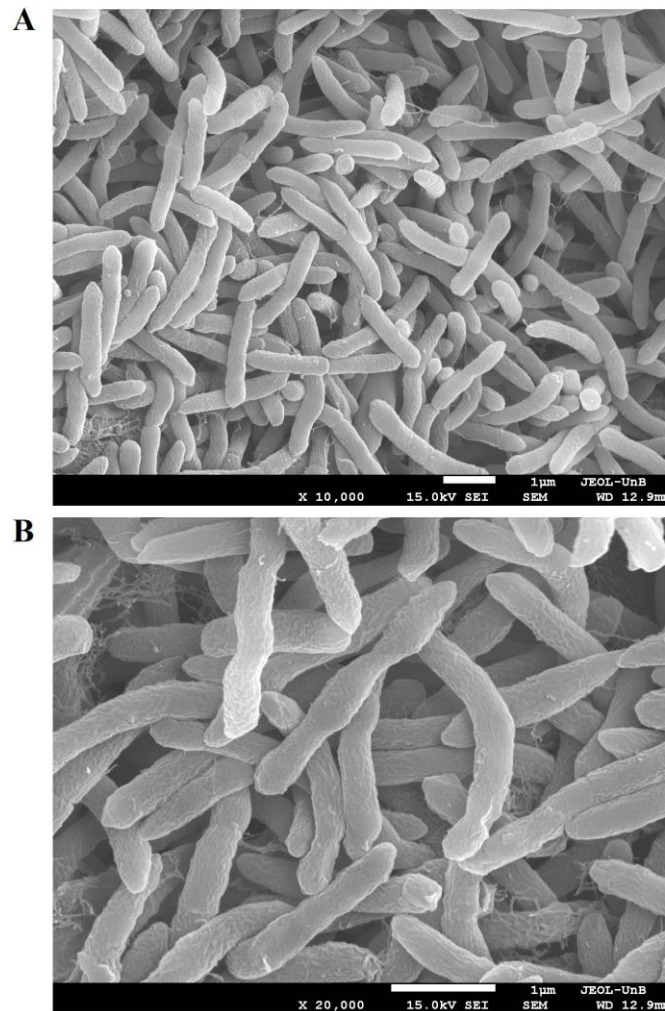
Nota. Muestra coloreada con tinción Gram y observada por el aumento del objetivo de 100X.

En la Figura 8, se muestra la caracterización morfológica de la cepa A1_50L2 realizada por microscopía electrónica de barrido. La

cepa A1_50L2 presentó forma de bacilo con extremos redondeados y sus medidas longitudinales promedio fueron de 2,1 – 4,0 μm de largo x 0,3 – 0,5 μm de ancho.

Figura 8

Microfotografía electrónica de barrido de la cepa A1_50L2



Nota. La cepa A1_50L2 fue cultivada en medio líquido reductor suplementado con 1% (p/v) de almidón, incubado a 55°C por 48 horas. A) Microfotografía aumentada a 10000X; B) Microfotografía aumentada a 20000X.

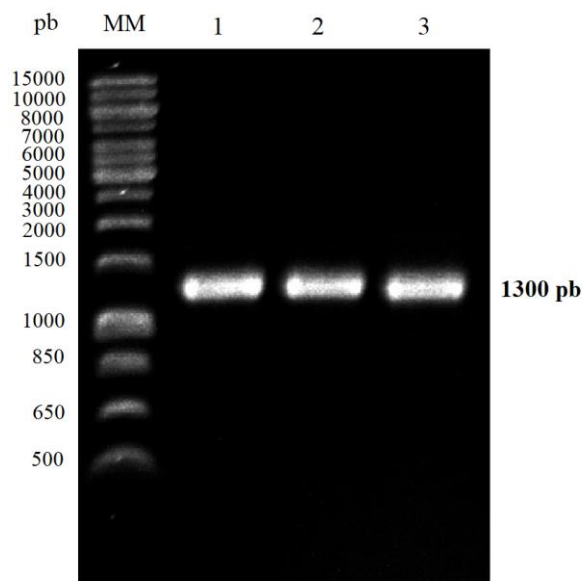
3.2. Identificación molecular de la cepa A1_50L2 por análisis de la secuencia del gen ARNr 16S

La extracción y purificación del material genético perteneciente a la cepa A1_50L2 fue considerada adecuada ya que generó un ADN genómico de alta calidad y con un rendimiento suficiente para realizar las reacciones de amplificación de PCR. El ADN genómico obtenido presentó un peso molecular mayor a 10 kb con una relación 260/280 nm de 1,9 y una concentración media de 300 ng/mL.

El ADN obtenido se utilizó para la reacción de amplificación de PCR con oligonucleótidos específicos (primers). En la Figura 9 se observa el producto de amplificación (amplicon) de la región del gen ARNr 16S con 1300 pares de bases (pb).

Figura 9

Amplificación del gen ARNr 16S de la cepa A1_50L2



Nota. Carril MM: marcador molecular de DNA (Thermo Fisher Scientific); Carril 1, 2 y 3: representan los productos amplificados del gen ARNr 16S del aislado A1_50L2.

El Anexo 6, muestra el resultado del secuenciamiento del amplicon (1300 pb) mediante un gráfico de electroferograma obtenido de la secuenciación del gen ARNr 16S del aislado A1_50L2. Después del análisis bioinformático utilizando el programa Genious v.5.11.1.2 se obtuvo la secuencia consenso del gen ARNr 16S que se depositó en el Genbank del NCBI (Anexo 7).

La Tabla 7 presenta el BLAST realizado, donde la secuencia consenso del gen ARNr 16S perteneciente a la cepa A1_50L2 fue comparado por alineamiento de secuencias contra secuencias de nucleótidos ARNr 16S existentes en el banco de datos del GenBank (NCBI).

Los resultados revelaron que el 100% del query secuenciado de la cepa A1_50L2 presentó matches con el hit de la cepa *Paenibacillus barengoltzii* strain SAFN-016 resultando en una identidad de 99,8 % y para la cepa *Paenibacillus barengoltzii* strain NBRC-101215 de 99,3 %. Los demás datos obtenidos presentaron identidades bajas de 97,5 % y 97,6 % para las cepas como *Paenibacillus timonensis* strain 2301032 y *Paenibacillus phoenicis* strain 3PO2SA, respectivamente.

Tabla 7

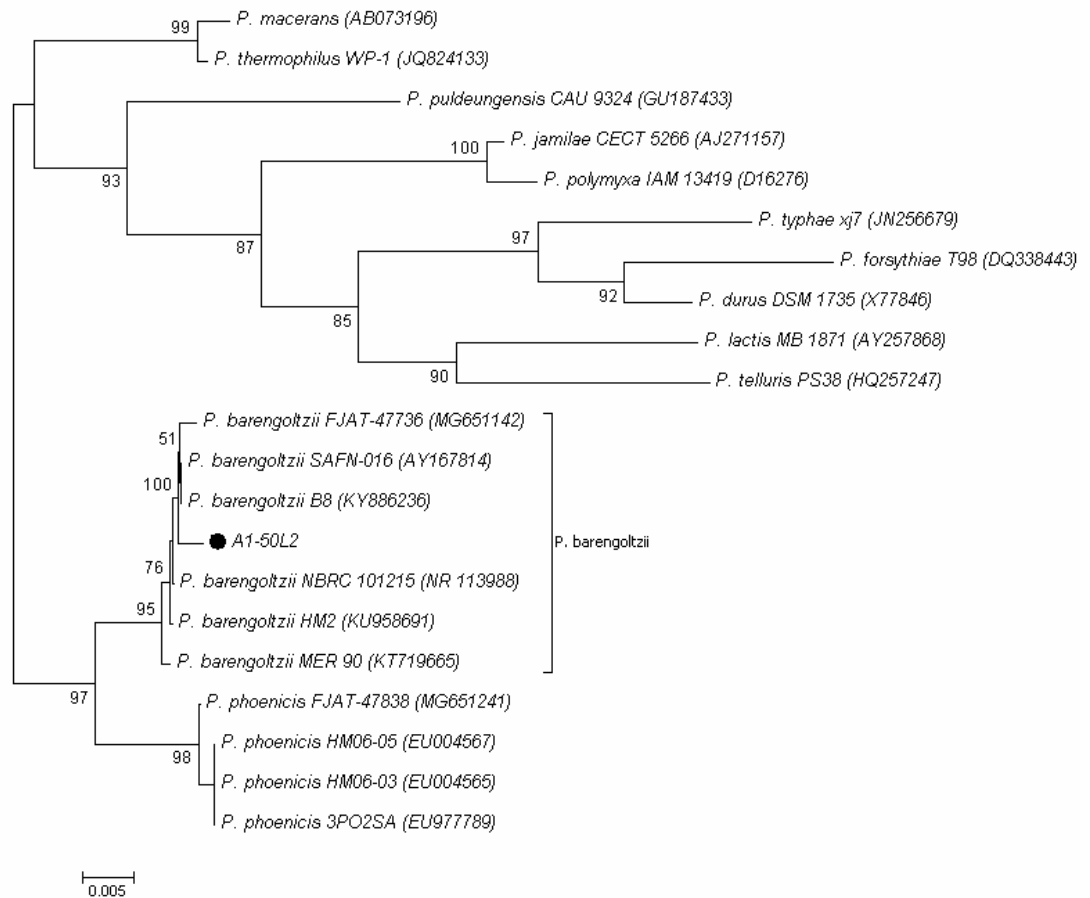
BLASTn de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado A1_50L2 contra secuencias depositadas en el GenBank

Bacteria	BLASTN				N° Acceso
	Descripción	Cobertura %	E Value	Identidad %	
A1_50L2	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> strain SAFN-016	100	0,0	99,8	NR_042756.1
	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> strain NBRC 101215	100	0,0	99,3	NR_113988.1
	<i>Paenibacillus timonensis</i> 2301032	100	0,0	97,5	NR_115198.1
	<i>Paenibacillus phoenicis</i> strain 3PO2SA	100	0,0	97,6	NR_108292.1

La Figura 10 representa el árbol filogenético construido de las secuencias de ARNr 16S obtenidas del análisis del BLASTn. En este resultado, la secuencia A1_50L2 mostrada con el símbolo en negrita se alineó junto con las secuencias de cepas de *P. barengoltzii*.

Figura 10

Árbol filogenético del gen ARNr 16S de especies de Paenibacillus



Nota. La secuencia de *P. barengoltzii* A1_50L2 está resaltada con el símbolo en círculo en negrita.

3.3. Curva de crecimiento y producción de la enzima α -amilasa por *P. barengoltzii* A1_50L2 en medio líquido

En la Tabla 8 se presenta el análisis comparativo de las medias de los 6 tratamientos realizados desde las 0 horas hasta las 48 horas para evaluar la curva de crecimiento de *P. barengoltzii* A1_50L2. Se puede observar que el valor medio de estos

tratamientos es numéricamente distinto, de hecho, la media de las 12 horas presentó un valor medio mayor que las demás; mientras que la media de las 24 horas tiene un valor casi equivalente a la media de las 36 horas.

Tabla 8

Análisis comparativo de las medias de los tratamientos de la curva de crecimiento de P. barengoltzii A1_50L2

Horas	N	Suma	Media	Varianza
0	3	0,014	0,0046	0,0000063
6	3	0,320	0,1066	0,0000563
12	3	2,686	0,8953	0,0000123
24	3	2,530	0,8433	0,0001003
36	3	2,510	0,8366	0,0000043
48	3	2,426	0,8086	0,0000163

En la Tabla 9 se muestra los resultados del análisis de varianza que contrasta las medias de los tratamientos. El valor-F tuvo un valor de 15464,56; además se observa que el valor-P tiene un valor de $< 0,0001$, que es menor que el nivel de significancia 0,05; por tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos de la curva de crecimiento.

Tabla 9

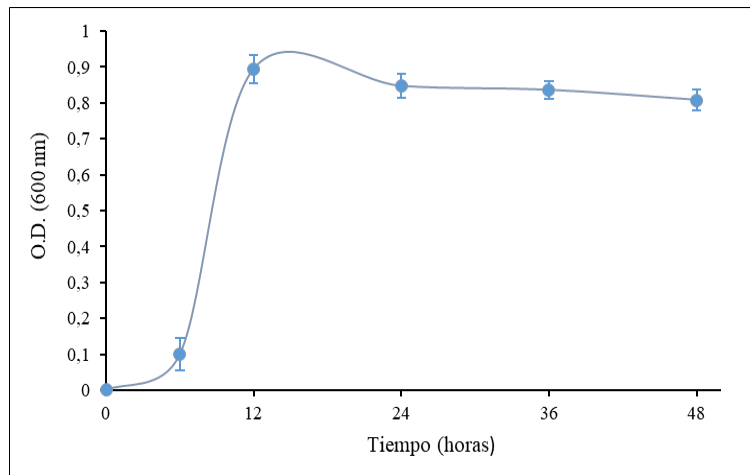
Análisis de varianza de un factor para la curva de crecimiento de P. barengoltzii A1_50L2

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	valor-P
Entre grupos	2,525878	5	0,5051756	15464,56	< 0,0001
Dentro de los grupos	0,000392	12	0,0000326		
Total	2,52627	17			

La Figura 11 exhibe un gráfico de puntos de la curva de crecimiento. Se observó que la cepa A1_50L2 llegó a su fase exponencial después de 6 horas de incubación y alcanzó su fase estacionaria (crecimiento máximo) a las 12 horas de incubación.

Figura 11

Curva de crecimiento de la cepa P. barengoltzii A1_50L2



Nota. Las barras de error simbolizan la desviación estándar de las réplicas técnicas.

En la Tabla 10 se presenta un análisis comparativo de las medias de los 6 tratamientos realizados (de 0 horas a 48 horas de incubación) para evaluar la curva de inducción enzimática de α -amilasa producido por *P. barengoltzii* A1_50L2. Se puede observar que el valor medio de estos tratamientos es numéricamente distinto, de hecho, la media del tratamiento de 12 horas presentó un valor medio mayor que las demás; mientras que la media del tratamiento de 24 horas tiene un valor que se aproxima a la media del tratamiento de 36 y 48 horas.

Tabla 10

Análisis comparativo de las medias de los tratamientos de la curva de inducción enzimática de P. barengoltzii A1_50L2

Horas	N	Suma	Media	Varianza
0	3	0,0170	0,0056	0,0000093
6	3	0,5423	0,1807	0,0000444
12	3	1,5411	0,5137	0,0000079
24	3	0,2764	0,0921	0,0000560
36	3	0,2169	0,0723	0,0000114
48	3	0,1781	0,0593	0,0000116

En la Tabla 11 se muestra los resultados del análisis de varianza que contrasta las medias de los tratamientos de la inducción enzimática. El valor-F tuvo un valor de 4392,96; además se observa que el valor-P tiene un valor $< 0,0001$, que es menor que el nivel de significancia 0,05; por tanto, existe una diferencia estadísticamente

significativa entre las medias de los tratamientos de la curva de inducción enzimática de la enzima α -amilasa.

Tabla 11

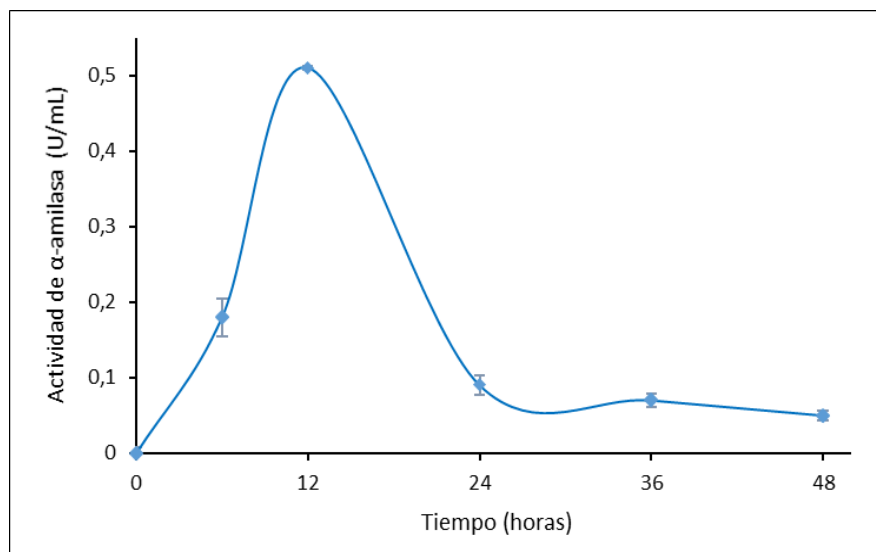
*Análisis de varianza de un factor para la curva de inducción enzimática de la enzima α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2*

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	valor-P
Entre grupos	0,514683	5	0,1029367	4392,96	< 0,0001
Dentro de los grupos	0,000281	12	0,0000234		
Total	0,514965	17			

La Figura 12 muestra un gráfico de puntos del análisis de la curva de inducción enzimática, en la cual *P. barengoltzii* A1_50L2 alcanzó un valor inicial de 0,18 U.mL⁻¹ en un tiempo de 6 horas de incubación y un valor máximo de 0,51 U.mL⁻¹ a las 12 horas de incubación y, después de este tiempo, la actividad de α -amilasa disminuye considerablemente a lo largo de un periodo de 48 horas.

Figura 12

Curva de inducción enzimática de la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2



Nota. Las barras de error simbolizan la desviación estándar de las réplicas técnicas.

El sobrenadante enzimático obtenido a través del cultivo de 12 horas de *P. barengoltzii* A1_50L2 fue sometido a ultrafiltración utilizando una membrana Millipore con rango de exclusión de 10 kDa. La Tabla 12 detalla los resultados obtenidos después de ultrafiltrar y concentrar 10 veces la muestra enzimática registrándose valores de actividad enzimática y actividad específica de $5,1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $8,2 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 12*Ultrafiltración del sobrenadante*

Muestra	Actividad enzimática (U.mL ⁻¹)	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	Actividad específica (U.mg ⁻¹)
Sobrenadante 1X	0,55	0,068	8,1
Sobrenadante concentrado 10X	5,1	0,62	8,2

3.4. Purificación parcial de la enzima α -amilasa por cromatografía líquida

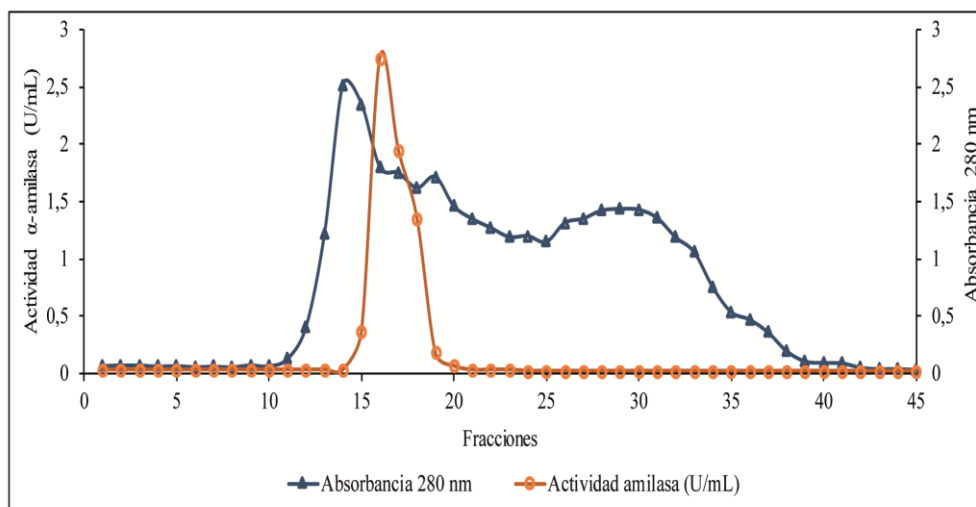
La Figura 13 muestra la primera fase de purificación de la enzima α -amilasa realizado en una columna de exclusión molecular con matriz Sephacryl S100. Se observa un perfil de absorbancia de 280 y 620 nm que detecta la presencia de proteínas y actividad α -amilasa, respectivamente.

Asimismo, las mayores actividades de α -amilasa fueron detectadas entre las fracciones 16, 17 y 18 (valores de 2,75; 1,94 y 1,35 U.mL⁻¹, respectivamente); estas fracciones fueron reunidas, analizadas por gel desnaturizante SDS-PAGE y aplicadas a una nueva columna de intercambio aniónico DEAE-Sepharose. También se observó proteínas que eluyeron entre las fracciones 10 y 14, y

otra entre las fracciones 20 y 35, las cuales fueron descartadas ya que no presentaron actividad α -amilasa (Figura 13).

Figura 13

Perfil cromatográfico de exclusión molecular

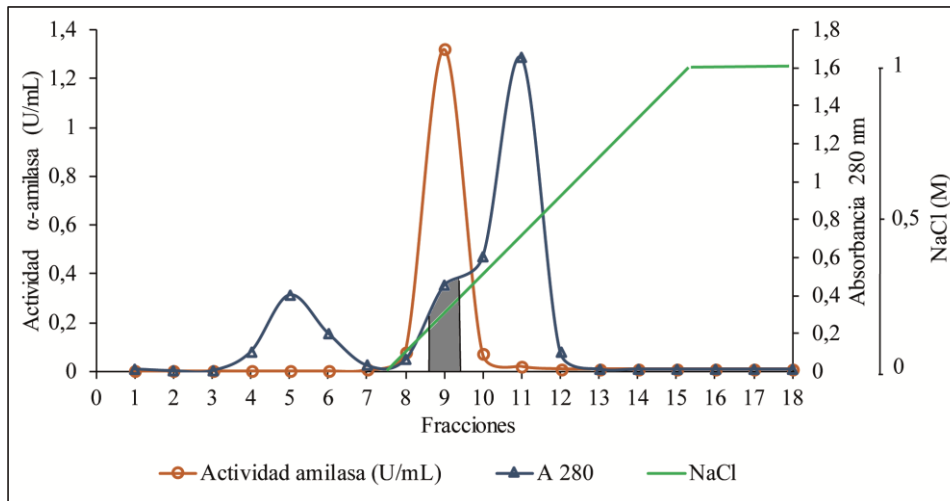


Nota. Corrida cromatográfica usando una columna cromatográfica Sephacryl S100 a pH 8,0.

La Figura 14 muestra el perfil cromatográfico de la segunda fase de purificación realizada en una columna cromatografía con matriz DEAE-Sepharose en pH 8,0. Se detectaron dos picos principales de proteínas: uno menor al inicio de la corrida, entre las fracciones 4 y 6, y otro mayor entre las fracciones 8 y 12. La enzima α -amilasa fue eluída en la fracción 9 al aplicarse un gradiente salino en la concentración de 0,3 M y presentó actividad α -amilasa con un valor de 1,3 U.mL⁻¹. Seguidamente, la fracción 9 fue analizada por SDS-PAGE y empleada su estudio de caracterización enzimática.

Figura 14

Perfil cromatográfico de intercambio aniónico



Nota. Corrida cromatográfica utilizando una columna con matriz DEAE-Sepharose a pH 8,0.

En la Tabla 13, se muestra la tabla de purificación donde se evalúa las fases de purificación de la α -amilasa. Así mismo, se obtuvieron los parámetros de purificación tales como la actividad α -amilasa la cual finalizó con un valor de $1,3 \text{ U.mL}^{-1}$. Por otro lado, la actividad específica incrementó, desde un valor inicial de $8,2$ y finalizando con un valor de $54,2 \text{ U.mg}^{-1}$. También se obtuvo un rendimiento de $25,5 \%$ de purificación y un índice de purificación final de $4,4$.

Tabla 13

*Etapas de la purificación parcial de la α -amilasa producida por *P. barengoltzii* A1_50L2*

Etapas	Actividad α -amilasa (U.mL ⁻¹)	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	Actividad específica (U.mg ⁻¹)	Rend. (%)	Índice de Purificación
Sobrenadante concentrado	5,1	0,62	8,2	100	1,0
Sephacryl S100	2,7	0,22	12,3	52,9	1,5
DEAE-Sepharose	1,3	0,024	54,2	25,5	4,4

3.5. Caracterización enzimática de la enzima α -amilasa

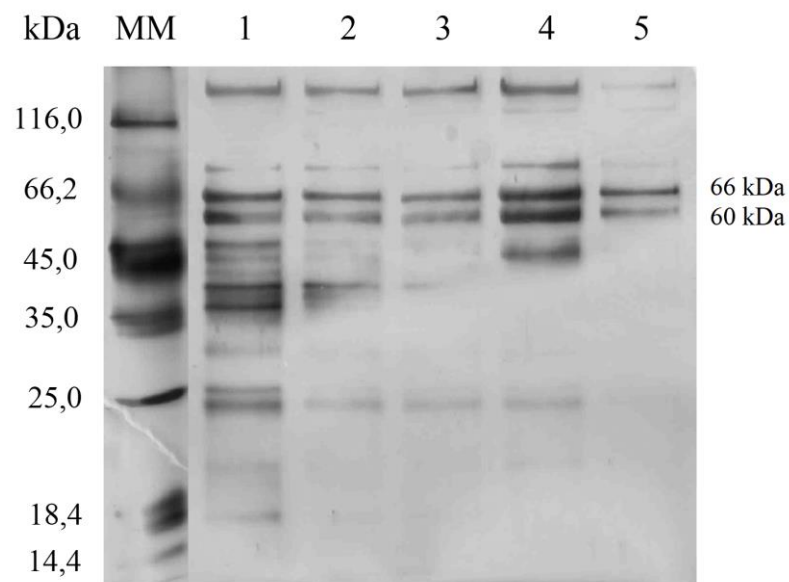
3.5.1. Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE y Zimograma

Para evaluar el grado de pureza de las fracciones cromatográficas fue necesario analizarlas mediante electroforesis en gel desnaturizante (Figura 15). El carril 1 representa el perfil de proteínas del sobrenadante de *P. barengoltzii* cultivado 12 horas en medio líquido conteniendo almidón 1% (p/v) como fuente de carbono, el cual presentó bandas proteicas con pesos moleculares en un rango entre 18 kDa y 130 kDa con un acentuado número de bandas proteicas entre 35 kDa y 66 kDa. Así mismo, los carriles 2, 3 y 4, son las fracciones proteicas con actividad α -amilasa, las cuales eluyeron después se someter el sobrenadante a cromatografía

de exclusión molecular. El carril 5, es la fracción proteica con actividad α -amilasa que eluyó después de la segunda fase cromatográfica de intercambio aniónico; la cual denota una purificación parcial de la enzima α -amilasa observándose 2 bandas proteicas definidas de 60 kDa y 66 kDa (Figura 15).

Figura 15

Electroforesis de las fases de purificación de la α -amilasa



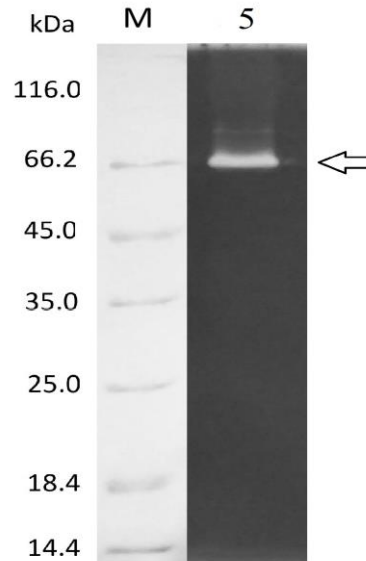
Nota. Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) al 12%. Carril MM: marcador molecular de proteínas; carril 1: sobrenadante; carril 2, 3 y 4: fracciones 16, 17 y 18 de Sephacryl S100; carril 5: fracción 9 de DEAE-Sepharose.

La Figura 16, muestra el análisis de zimograma (actividad en gel) de la enzima α -amilasa. La enzima

parcialmente purificada presentó una banda de hidrólisis determinándose un peso molecular de 66 kDa.

Figura 16

Análisis de zimograma



Nota. Zimograma en gel desnaturalizante al 12%. Carril M: marcador molecular de proteínas; carril 5: fracción 9 proveniente de cromatografía DEAE-Sepharose.

3.5.2. Efecto del cambio de pH sobre la actividad de la enzima α -amilasa

La Tabla 14 expone los resultados del análisis comparativo de las medias de los 8 tratamientos para determinar el efecto del cambio de pH sobre la actividad α -amilasa expresada en unidades enzimáticas ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), donde se realizaron ensayos enzimáticos variando el pH desde 3

hasta 10. Se puede observar que el valor medio de estos tratamientos es numericamente proximo entre varios de ellos, de hecho, la media del tratamiento a pH 7 tiene un valor casi equivalente a la media del tratamiento a pH 6; además que presentaron las mayores actividades enzimáticas.

Tabla 14

Análisis comparativo de las medias de los tratamientos del ensayo de actividad α -amilasa frente al cambio de pH

pH	N	Suma	Media (U/ml)	Varianza
3	3	0,199	0,066	0,000562
4	3	0,160	0,054	0,000932
5	3	1,795	0,599	0,000908
6	3	2,358	0,786	0,000470
7	3	2,340	0,780	0,000477
8	3	2,003	0,668	0,000220
9	3	1,846	0,616	0,000139
10	3	0,687	0,229	0,000783

Así mismo, se realizó el análisis de varianza de un factor de la actividad enzimática, donde se compararon las medias de los tratamientos para los 8 niveles de pH realizados.

La Tabla 15 muestra que el valor-F, que en este caso fue un valor de 508,93, representa el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de los grupos,

además se observa que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; por tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la actividad α -amilasa entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 15

Análisis ordinario de varianza para la actividad α -amilasa frente a la variación del pH

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	2,001083	7	0,285869	508,93	< 0,0001
Dentro de los grupos	0,008987	16	0,000562		
Total	2,01007	23			

Adicionalmente, la Tabla 16 muestra los resultados de comparaciones múltiples de las medias de cada tratamiento estudiado mediante la prueba de Tukey para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se identificaron 5 grupos homogéneos en los cuales, las mayores actividades enzimáticas obtenidas fueron en pHs 6 y 7. Estas no difieren entre sí, ya que presentaron la misma letra A. El tratamiento con pH 8 no difiere del pH 9, el pH 9 no difiere del pH 5; sin embargo, el pH 8 difiere del pH 5 y el pH 10 difiere de los demás.

Tabla 16

Prueba de Tukey de medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática frente al cambio de pH

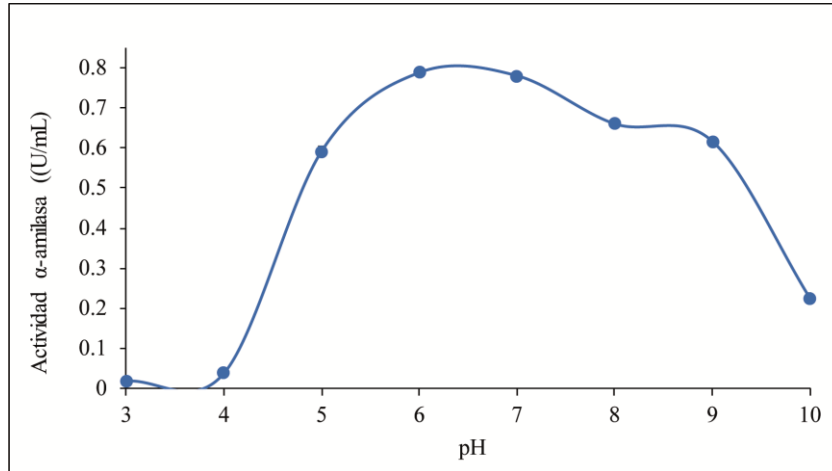
pH	Medias (U/mL)	N	E.E.	Agrupación		
6	0,786	3	0,01368	A		
7	0,780	3	0,01368	A		
8	0,668	3	0,01368		B	
9	0,616	3	0,01368		B	C
5	0,599	3	0,01368			C
10	0,229	3	0,01368			D
3	0,066	3	0,01368			E
4	0,054	3	0,01368			E

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La figura 17 representa la actividad α -amilasa frente al cambio de pH, en el cual se observa altos valores de actividad en un amplio rango de pHs que van de 5 a 9, destacándose una actividad máxima de $0,79 \text{ U.mL}^{-1}$ a pH 6. La actividad enzimática fue notoriamente más baja en pH 10, siendo detectada una actividad apenas de $0,23 \text{ U.mL}^{-1}$, mientras que en pHs 3 y 4 se detectaron actividades muy bajas.

Figura 17

Efecto del pH sobre la actividad α -amilasa



3.5.3. Efecto del cambio de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -amilasa

La Tabla 17 exhibe los resultados del análisis comparativo de las medias de los 9 tratamientos para determinar el efecto del cambio de la temperatura sobre a la actividad α -amilasa expresada en unidades enzimáticas ($U \cdot mL^{-1}$), donde se realizaron ensayos variando la temperatura desde 30 hasta 75 °C. Se puede observar que el valor medio de estos tratamientos es numéricamente distinto, de hecho, la media del tratamiento a temperatura de 60 °C presentó un valor medio mayor que los demás; mientras que las medias de 30 y 75 °C fueron las menores.

Tabla 17

Análisis comparativo de las medias de los tratamientos de la actividad α -amilasa frente al cambio de la temperatura

Temperatura	N	Suma	Media (U/ml)	Varianza
30	3	0,654	0,218	0,000110
40	3	2,057	0,686	0,000075
45	3	2,370	0,790	0,000021
50	3	2,630	0,877	0,000060
55	3	2,756	0,919	0,000031
60	3	2,946	0,982	0,000022
65	3	2,233	0,744	0,000059
70	3	1,910	0,637	0,000058
75	3	0,440	0,147	0,000055

También, se realizó el análisis de varianza ordinario de la actividad enzimática, donde se compararon las medias de los tratamientos para los 9 niveles de temperatura realizados.

En la Tabla 18 se muestra que el valor-F, que en este caso fue un valor de 4810,56, representa el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de los grupos, además se observó que el valor-P de la prueba-F fue menor que 0,05; de tal forma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la actividad α -amilasa entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 18

Análisis ordinario de varianza para la actividad α -amilasa frente la variación de la temperatura

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	2,104515	8	0,263064	4810,56	< 0,0001
Dentro de los grupos	0,000984	18	0,000055		
Total	2,105499	26			

Adicionalmente, la Tabla 19 muestra los resultados de comparaciones múltiples de las medias de cada tratamiento mediante la prueba de Tukey para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se identificaron 9 grupos diferentes en los cuales todos los tratamientos difieren entre si y las mayores actividades enzimáticas obtenidas fueron a temperaturas de 55 y 60 °C.

Tabla 19

Prueba de Tukey de medias de los tratamientos del ensayo de actividad enzimática frente al cambio de temperatura

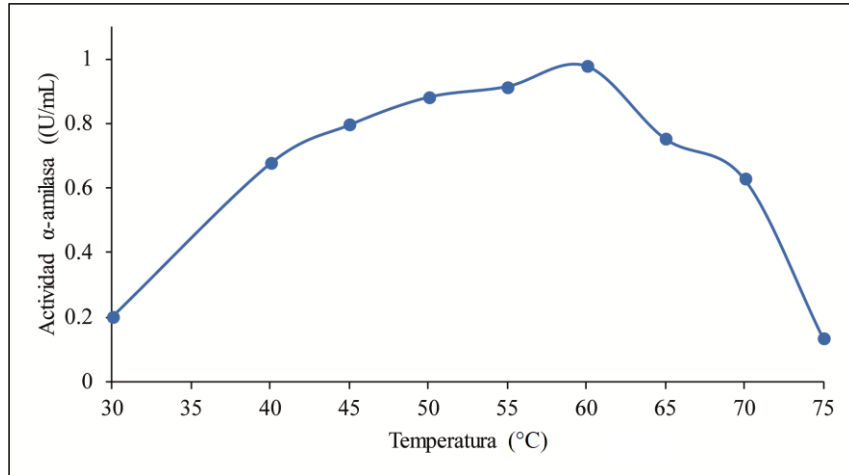
Temp (°C)	Medias (U/mL)	N	E.E.	Agrupación
60	0,98	3	0,00	A
55	0,92	3	0,00	B
50	0,88	3	0,00	C
45	0,79	3	0,00	D
65	0,74	3	0,00	E
40	0,69	3	0,00	F
70	0,64	3	0,00	G
30	0,22	3	0,00	H
75	0,15	3	0,00	I

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La Figura 18 exhibe un gráfico de puntos de la actividad α -amilasa frente al cambio de la temperatura, en el cual se observa altos valores de actividad en un amplio rango de temperatura que van de 40 hasta 70 °C, destacándose una actividad máxima de 0,98 U.mL⁻¹ a 60 °C. Sin embargo, la actividad fue notoriamente más baja a 30 y 75 °C detectándose valores de 0,22 U.mL⁻¹ y 0,15 U.mL⁻¹, respectivamente.

Figura 18

Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad α -amilasa



3.5.4. Determinación de la estabilidad térmica de la enzima α -amilasa

La Tabla 20 detalla los resultados de la estabilidad térmica de la enzima α -amilasa expresada en actividad relativa (%), donde se realizaron ensayos enzimáticos cuando la enzima fue evaluada en dos temperaturas diferentes siendo a 50 y 60 $^{\circ}\text{C}$ a lo largo de 96 horas de incubación.

Tabla 20

Termoestabilidad de la enzima α -amilasa a 50 °C y 60 °C

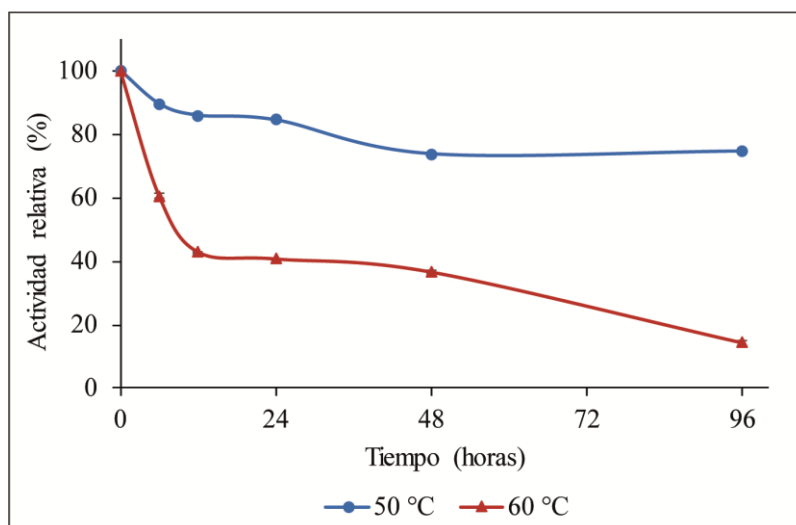
Tiempo (horas)	Actividad relativa (%)			
	50 °C	DE	60°C	DE
0	100	±0,31	100	±0,45
6	89,5	±0,56	60,5	±0,67
12	85,8	±0,66	42,8	±0,33
24	84,3	±0,26	40,6	±0,28
48	73,7	±0,51	36,5	±0,51
96	74,6	±0,73	14,2	±0,65

Nota. DE= Desviación estándar.

Los resultados mostrados en la Figura 19 indicaron que la enzima α -amilasa mantiene un 90% de actividad relativa después de 6 horas de incubación a 50 °C y, cuando se incubó a 60 °C la actividad relativa fue de 61%. Después de 24 horas de incubación, la enzima mantuvo 84% de la actividad relativa a 50°C y 41% de la actividad relativa cuando fue incubada a 60°C. Con 96 horas de incubación, la actividad relativa de la α -amilasa se mantuvo en 75% a 50 °C y se observa que la actividad relativa disminuye hasta un 14% a 60°C después del largo periodo de incubación de 96 horas (Figura 19).

Figura 19

Análisis de la estabilidad térmica a 50 y 60°C



3.5.5. Efecto de los iones metálicos y compuestos químicos sobre la actividad α -amilasa

La Tabla 12 muestra los resultados del efecto inhibitorio o activador de los iones metálicos y compuestos químicos en las concentraciones de 1 mM y 10 mM sobre la actividad α -amilasa.

Tabla 21

Efecto de iones y compuestos químicos sobre la actividad relativa de la α -amilasa

Compuesto	Actividad Relativa (%)			
	1 mM	DE	10 mM	DE
Control	100	$\pm 0,3$	100	$\pm 0,6$
MgCl ₂	96,6	$\pm 0,2$	92,4	$\pm 0,05$
FeCl ₃	94,1	$\pm 0,2$	0	$\pm 0,8$
KCl	99,6	$\pm 0,2$	95,0	$\pm 0,2$
NaCl	97,1	$\pm 0,2$	96,4	$\pm 0,2$
ZnCl ₂	91,5	$\pm 0,7$	0	$\pm 1,3$
CaCl ₂	92,7	$\pm 0,07$	96,7	$\pm 0,2$
CuCl ₂	57,0	$\pm 0,4$	0	$\pm 0,6$
CoCl ₂	108,3	$\pm 0,2$	46,5	$\pm 0,2$
MnCl ₂	96,9	$\pm 0,2$	81,6	$\pm 0,6$
HgCl ₂	4,40	$\pm 0,6$	0	$\pm 0,9$
EDTA	88,0	$\pm 1,0$	77,7	$\pm 1,4$
β -Mercaptoetanol	101,2	$\pm 0,1$	100,5	$\pm 0,1$
DTT	98,0	$\pm 0,4$	81,2	$\pm 0,2$
SDS	68,2	$\pm 0,4$	26,4	$\pm 0,2$

Nota. DE= Desviación estándar.

Los compuestos que presentaron mayor efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática fueron Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Hg²⁺ y SDS.

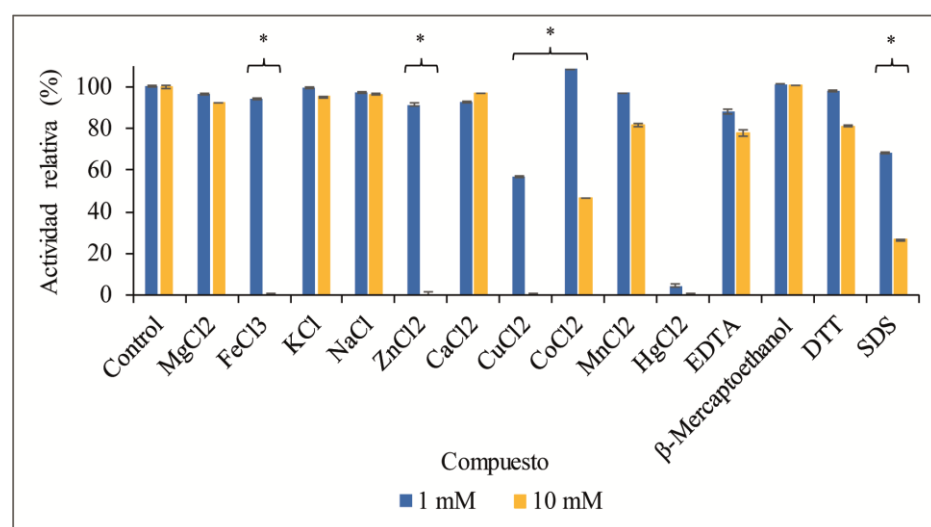
Los iones Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ y Hg²⁺ en la concentración de 10 mM inhibieron completamente la actividad enzimática,

mientras que en la concentración de 1 mM inhibieron 6%, 8%, 43% y 96%, respectivamente. Adicionalmente, el ion Co^{2+} incrementó la actividad enzimática (8%) en la concentración de 1 mM, sin embargo, el mismo compuesto en la concentración de 10 mM inhibió la actividad en 46,5% (Figura 20).

El agente aniónico SDS tuvo efecto inhibitorio sobre la actividad α -amilasa a una concentración de 1 mM inhibiendo 32%, mientras que en la concentración de 10 mM fue de 74%.

Figura 20

Efecto de los iones metálicos y compuestos químicos sobre la actividad relativa de la α -amilasa



Nota. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas técnicas, (*) $p < 0,05$.

IV. DISCUSIÓN

Reactivación y caracterización microscópica de la cepa A1_50L2

La cepa A1_50L2 identificada por el análisis de la secuencia ARNr 16S como *P. barengoltzii* fue capaz de crecer en medio líquido reductor conteniendo almidón como fuente de carbono a 55 °C por 2 días de incubación.

Se tiene conocimiento que las especies del género *Paenibacillus* pueden ser Gram positivas, Gram negativas o variables Gram (Grady et al., 2016).

En el presente estudio, la tinción Gram permitió caracterizar a la cepa termófila A1_50L2 en el grupo de bacterias Gram positivas, el cual según Smith y Hussey (2005) atribuyen a bacterias que contienen paredes celulares con alto contenido de peptidoglucano (90% de la pared celular). Además, este resultado se correspondió con estudios previos, el cual caracterizaron a *P. barengoltzii* como una bacteria Gram positiva (Osman et al., 2006; Ticona et al., 2020).

La cepa A1_50L2 también fue analizada por microscopía electrónica de barrido y los resultados obtenidos tales como la forma de bacilos con extremos redondeados junto con sus medidas longitudinales corresponden con las características morfológicas ya reportadas por Osman et al. (2016) para la especie *P. barengoltzii* SAFN-016.

Identificación molecular y validación de la cepa A1_50L2

El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S ha sido extensamente utilizada tanto para fines taxonómicos, como para fines filogenéticos y es considerado el método estándar de referencia para la identificación bacteriana (Rodicio y Mendoza, 2013).

El producto de amplificación (amplicón) de 1300 pb (Figura 9), fue el tamaño de fragmento esperado de acuerdo con los oligonucleótidos 63F y 1387R utilizados, tal como se relata en estudios previos de identificación bacteriana (Marchesi et al., 1998; Zhu et al., 2002).

El análisis de alineamiento (Tabla 7) mostró que la secuencia ARNr 16S del aislado A1_50L2 comparte el 99,8 % de similitud con la secuencia ARNr 16S de *P. barengoltzii* SAFN-016 que fue aislada de la instalación de ensamblaje de naves espaciales de la NASA (Osman et al., 2006) y apenas un 97,6 % con la secuencia ARNr 16S de *P. phoenicis* que fue aislada de una mina subterránea de molibdeno (Benardini et al., 2011). Además, el análisis de filogenia representado por el árbol filogenético (Figura 10) colocó a la cepa A1_50L2 junto con cepas de *P. barengoltzii* en un grupo separado de otras especies de *Paenibacillus*. También se puede observar que su vecino filogenético más cercano es *P. phoenicis*, mientras que otras especies más distantes son *P. macerans*, *P. jamaicae*, *P. polymyxa* y *P. lactis*.

Basados en los resultados de análisis filogenético, así como de caracterización morfológica, se concluyó que la cepa A1_50L2 que fue reactivada en medio líquido reductor suplementado con almidón, es una

cepa pura no contaminada y que pertenece a la especie de *P. barengoltzii* cepa A1_50L2.

Curva de crecimiento e inducción enzimática de *P. barengoltzii* A1_50L2

Las especies del género *Paenibacillus* se destacan por su capacidad para producir enzimas hidrolíticas tales como holocelulasas y algunas amilasas (Rajesh et al., 2013; Ticona et al., 2020; Xu et al., 2016), sin embargo, hasta el momento no se han reportado estudios sobre α -amilasas de *P. barengoltzii*.

En el presente trabajo, se evaluó la curva de crecimiento de la cepa *P. barengoltzii* A1_50L2 cultivada en medio líquido utilizando almidón como fuente de carbono y se obtuvo como resultado un tiempo ideal para cultivo de 12 horas de incubación donde alcanzó la fase estacionaria. Resultados similares fueron reportados para cepas termófilas como *Paenibacillus* sp. 2S-6, *Geobacillus* sp. IIPTN y *Bacillus* sp. strain WN11 (Dheeran et al., 2010; Ko et al., 2011; Mamo y Gessesse, 1999).

En el análisis de inducción enzimática, se encontró que la producción de la enzima α -amilasa de *P. barengoltzii* estaba asociada a su crecimiento, la cual tiene correlación con el reporte de Santos y Martins (2003), quienes indican que la producción de α -amilasa es paralela al crecimiento de *Bacillus* sp.

La producción de la enzima comenzó al inicio de la fase logarítmica y alcanzó su máximo cuando la población celular alcanzó la fase exponencial

(Figura 11). En estudios de caracterización enzimática de *Paenibacillus* sp. D9, *Paenibacillus* sp. 2S-6 y *Geobacillus* sp. IIPTN (Dheeran et al., 2010; Ko et al., 2011; Naidu et al., 2019) también mostraron la producción de α -amilasas durante la fase de crecimiento logarítmico en paralelo con el crecimiento de la masa celular. Además, se observó que el almidón soluble actuó como un fuerte inductor en el crecimiento bacteriano y la producción de la α -amilasa, una característica ya descrita en especies del género *Bacillus* y *Paenibacillus* (Santos y Martins, 2003; Rajesh et al., 2013).

Purificación parcial de la enzima α -amilasa

En la primera etapa de purificación por exclusión molecular se observó que las proteínas con actividad α -amilasa (fracciones 16, 17 y 18) eluyeron por separado del pico principal de proteínas (fracción 14 y 15), así como del resto de las otras fracciones proteicas, un indicativo de que esta etapa de purificación se mostró eficiente. De acuerdo con Mayolo-Deloisa et al. (2012), las proteínas de alto peso molecular presentan un tiempo de retención corto en la matriz siendo eluidas en las primeras etapas cromatográficas, mientras que proteínas de bajo peso molecular, el tiempo de retención es mayor siendo eluidas en la fase tardía de la cromatografía.

En la etapa cromatográfica de intercambio aniónico, el primer pico (fracciones 4, 5 y 6) correspondió a proteínas que no se ligaron a la matriz cargada positivamente (grupo funcional dietilaminoetil), mientras que las otras fracciones si se ligaron a la matriz. Según Cummins et al. (2011), al aplicar un gradiente de NaCl, las proteínas que se ligaron a la matriz irán

eluyendo en virtud de su carga negativa. En consecuencia, la fracción 9 con actividad α -amilasa eluyó con un gradiente salino de 0,3 M permitiendo su purificación parcial.

Los parámetros de purificación (Tabla 13) de la enzima α -amilasa registraron un incremento de la actividad específica (8,2 a 54,2 U.mg⁻¹). Estos resultados coinciden con lo establecido en la literatura, donde indican que la actividad específica aumenta con cada etapa de purificación, ya que, en esencia la purificación busca maximizar la actividad específica de la proteína (Berg et al., 2002).

Se encontró que la actividad específica (54,2 U.mg⁻¹), rendimiento (25,5 %) e índice de purificación (4,4) de la α -amilasa de *P. barengoltzii* son comparables con la α -amilasa (52,9 U.mg⁻¹; 15,5%; 9,2) purificada de *Paenibacillus* sp. PP70 (Tsukaki et al., 2012). También se encontraron parámetros de purificación similares para α -amilasas de *B. amyloliquefaciens* (Gangadharan et al., 2009) y *B. cereus* (Annamalai et al., 2011).

Caracterización enzimática de la enzima α -amilasa SDS-PAGE y Zimograma

En los análisis electroforéticos de proteína al 12%, se verificó que hubo una disminución de bandas proteicas después de cada etapa cromatográfica, indicando que la purificación fue eficiente. En la última etapa cromatográfica se observó la presencia de apenas 2 bandas proteicas, dentro de estas la enzima α -amilasa mostrada en la Figura 15.

El análisis de zimograma confirmó la presencia de la actividad α -amilasa en gel, indicando que la enzima presenta un peso molecular de 66 kDa. Amilasas son producidas por una diversidad de especies tales como *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* (Sindhu et al., 2016). Dheeran et al. (2010) reportaron una amilasa con peso molecular de 97 kDa de *Geobacillus* sp IIPN. Además, una α -amilasa purificada de *Paenibacillus* sp D9 mostró un peso molecular de 54 kDa (Naidu et al., 2019). También se reportó una α -amilasa purificada de *B. amyloliquefaciens* con un peso molecular de 58 kDa (Gangadharan et al., 2009) y una α -amilasa de *Paenibacillus* sp. SSG-1 con peso molecular de 71,7 kDa (Xu et al., 2016).

Efecto del pH

Las amilasas son enzimas industriales que cumplen un rol económico importante en el mercado de enzimas. Ogbonnaya y Odiase (2015), destacan la importancia de enzimas tolerantes al pH alcalino, principalmente en la industria de detergentes, así como enzimas termotolerantes.

Con relación a la actividad en pHs más alcalinos, al contrario, sobre lo ya descrito para amilasas de otras especies de *Paenibacillus*, la actividad α -amilasa de *P. barengoltzii* mantuvo su actividad enzimática tanto en pHs ácidos, como en alcalinos (Figura 17). De hecho, ya fue relatado la pérdida total de actividad enzimática a pHs 8, 9 y 10 en α -amilasas de *Paenibacillus amylolyticus* (Haq et al., 2012). Así como la pérdida total de actividad a pHs

5 y 6 de la amilasa de *Bacillus subtilis* CB-18 (Ogbonnaya y Odiase, 2015). Esta pérdida de actividad frente a distintos pHs está relacionada a su estructura y composición de cada enzima. Sindhu et al (2016), mencionan que la adaptación de α -amilasas frente a distintos pHs puede ser influenciada por la disminución de aminoácidos cargados negativamente y un aumento de residuos hidrofílicos incluyendo histidina, asparagina y glutamina, tomando las interacciones electrostáticas entre residuos, factores esenciales para tolerar ambientes con pH extremos.

Efecto de la temperatura

Sobre la temperatura, la actividad enzimática fue mayor entre las temperaturas de 55 y 60 °C, como ya descrito para la actividad pululanasa tipo 1 de *P. barengoltzii* CAU904 (Liu et al., 2016). Uno de los principales factores ya descritos para que estas enzimas mantengan sus actividades a altas temperaturas es la interacción de proteínas, pues se ha relatado una fuerte correlación con respecto a los enlaces disulfuro entre las proteínas y el mantenimiento de la estabilidad térmica (Rigoldi et al., 2018).

Termoestabilidad

Con respecto a la estabilidad térmica de la α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, se encontraron mejores resultados de estabilidad en comparación con la α -amilasa de *P. amylolyticus* e incluso con una α -amilasa comercial de *B. licheniformis* (Haq et al., 2012). Para la α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, después de 6 horas de incubación a 60 °C, se

registró una pérdida de 40% de actividad, mientras que para la α -amilasa comercial de *Bacillus licheniformis* fue descrita una pérdida de 50% de actividad a 60 °C, en el mismo periodo de incubación (Declerck et al., 2003).

La α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2 presentó una estabilidad térmica óptima y que podría ser aplicada en procesos industriales, pues por ser termoestable, esta puede ser almacenada a temperatura ambiente sin perder actividad enzimática. Además, posee tolerancia a 60°C, y en caso de pretratamientos que generan alta temperatura, no sería necesario el resfriamiento total del proceso, evitando mayores gastos en la obtención de bioproductos como el etanol (Sindhu et al., 2016).

Efecto de los iones metálicos

Con respecto a los análisis de los iones metálicos y su efecto sobre la actividad α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, la inhibición por los iones Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} se atribuye a la interacción de estos metales con los grupos sulfhidrilo (presentes en residuos de cisteína), así como con residuos nitrogenados (como lisina e histidina) asociados al centro activo de la enzima (Nieboer y Richardson, 1980).

Xu et al. (2016) también relataron una fuerte inhibición de la actividad de una α -amilasa de *Paenibacillus* sp SSG1 por los iones Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} en la misma concentración considerada en este trabajo. Por otro lado, la actividad aumentó en presencia de Co^{2+} . De la misma forma, la α -amilasa de *Geobacillus* sp IIPTN también fue activada en presencia de Co^{2+}

(Dheeran et al., 2010). La inhibición por parte de compuestos como SDS y EDTA, también fue observada en la α -amilasa de *Paenibacillus* sp SSG1 (Xu et al., 2016).

Cabe destacar que la actividad α -amilasa no fue alterada en presencia de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} y Ca^{2+} , tanto en la concentración de 1 mM como en 10 mM. De forma general las α -amilasas en su mayoría son dependientes del ion Ca^{2+} (Salem et al., 2020). Al contrario de la α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, ya fueron descritas diversas amilasas que mostraron un incremento significativo en su actividad enzimática en presencia de este ion Ca^{2+} , como las de *Paenibacillus* sp. SSG1 (Xu et al., 2016), *Paenibacillus* sp. D9 (Naidu et al., 2019) y *Paenibacillus* sp. (Rajesh et al., 2013). Por ese motivo, en determinados procesos industriales en que estas enzimas son utilizadas, la adición de Ca^{2+} se torna necesaria para una mayor eficiencia de la enzima. Tal adición implica en más etapas en el proceso y en un aumento de costos de producción. Por consecuencia, existe una creciente búsqueda por α -amilasas independientes de Ca^{2+} (Sindhu et al., 2016). En ese sentido, la α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2 mostró no ser dependiente de Ca^{2+} presentando parámetros óptimos para su aplicación industrial en distintos campos como etanol y licuefacción de almidón y detergentes.

V. CONCLUSIONES

- La cepa termófila *P. barengoltzii* A1_50L2 fue capaz de crecer en medio líquido reductor suplementado con almidón, secretando enzimas α -amilasas en un tiempo de 12 horas.
- La cepa termófila *P. barengoltzii* A1_50L2 fue caracterizada morfológicamente siendo bacilos Gram positivos con extremos redondeados, así como su identificación molecular mediante la amplificación del fragmento ARNr 16S.
- La estrategia de purificación enzimática fue eficiente obteniéndose una purificación parcial con 3 bandas proteicas en 2 etapas cromatográficas de exclusión molecular e intercambio aniónico.
- La α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, por presentar actividad enzimática entre 50 y 70 °C, puede ser considerado su uso potencial para su utilización en procesos industriales llevados a cabo a altas temperaturas.
- La α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, al contrario de otras amilasas descritas en la literatura, es más activa en pH básico, lo que puede representar una posible aplicación en procesos que utilizan pHs alcalinos, como en la industria de detergentes.
- La α -amilasa de *P. barengoltzii* A1_50L2, mostró ser una enzima que mantiene su actividad enzimática independiente del ion Ca^{2+} , característica considerada positiva del punto de vista de aplicaciones industriales

VI. RECOMENDACIONES

- Para conseguir una purificación total, se sugiere realizar una etapa cromatográfica adicional siendo una cromatografía exclusión molecular en columna Sephadex G75.
- Realizar la caracterización de la α -amilasa en relación a sus parámetros cinéticos (K_{cat} , $V_{m\acute{a}x}$ y K_m).
- Se sugiere realizar análisis por HPLC de los productos de hidrólisis producidos por la acción de la enzima α -amilasa de *P. barengoltzii*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. y Balasubramanian, T. (2011). Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal Microbiology*, 51(4), 424–429.
- Ash, C., Priest, F. y Collins, D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(1), 253-260.
- BBC Research. (2017). Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Estados Unidos.
- Bearne, S. (2014). Illustrating the Effect of pH on Enzyme Activity Using Gibbs Energy Profiles. *ACS Publications*, 91(1), 84–90.
- Benardini, J. N., Vaishampayan, P. A., Schwendner, P., Swanner, E., Fukui, Y., Osman, S. y Venkateswaran, K. (2011). *Paenibacillus phoenicis* sp. nov., isolated from the Phoenix Lander assembly facility and a subsurface molybdenum mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 1338–1343.
- Benson, D., Cavanaugh, M., Clark, K., Karch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. y Sayers, E. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 41-47.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (2002). The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. *Biochemistry, 5th edition* (pp. 167-179). New York: Freeman and Company.

Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress Eric. *Agronomy, 7(3)*, 7-59.

Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in science, 1(6)*, 41-55.

Blum, H., Beier, H. y Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis, 8(2)*, 93-99.

Blume, L., Noronha, E., Leite, J., Queiroz, R., Ricart, C., de Sousa, M. y Felix, C. (2013). Characterization of *Clostridium thermocellum* Isolates Grown on Cellulose and Sugarcane Bagasse. *Bioenergy Research, 6(1)*, 763-775.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72(2)*, 248-254.

Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management, 51(1)*, 1412-1421.

- Cummins, P. M., Dowling, O. y O'Connor, B. F. (2011). Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase. Em *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology* (pp. 215-228). Berlin: Springer.
- Souza, P. M. y Oliveira, M. P. (2010). Application of microbial amylase in industry: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 850-861.
- Declerck, N., Machius, M., Yoyet, P., Wiegand, G., Huber, R. y Gaillardin, C. (2003). Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50°C temperature range. *Protein Engineering, Design and Selection*, 16(4), 287-293.
- Denardin, C. y Da Silva, L. P. (2008). Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, 2(1), 1-10.
- Dhawan, S., Singh, R., Kaur, R. y Kaur, J. (2016). A β -mannanase from *Paenibacillus* sp.: Optimization of production and its possible prebiotic potential. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(5), 669-678.
- Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y. K. y Adhikari, D. (2010). Characterization of hyperthermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. IIPNTN. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 1857-1866.

- Di Marco, E., Soraire, P., Romero, C., Villegas, L. y Martínez, M. (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23), 19057-19067.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Friedberg , F. (1983). On the primary structure of amylases . *FEBS Letters*, 152(2), 1-3.
- Fu, X., Yan, Q., Wang, J., Yang, S. y Jianga, Z. (2016). Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91(10), 973-979.
- Fu, X., Yan, Q., Yang, S., Yang, X., Guo, Y. y Jiang, Z. (2014). An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to N-acetyl glucosamine. *Biotechnology for Biofuels*, 174(7), 1-11.
- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry Biochemistry*, 41(5), 583-603.

- Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Sivaramakrishnan, S. y Pandey, A. (2009). Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Applied and Biochemical Biotechnology*, 158(1), 653–662.
- Garibyan, L. y Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 13(3), 1-8.
- GE Healthcare. (2007). *Protein purification: Principles and Methods*. Handbook. Sweden: Bio-Sciences AB.
- Geneious. (2020). Geneious Prime. <https://www.geneious.com/>
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. y Yuan, Z. C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1-18.
- Haki, G. y Rakshit, S. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hamann, P., Serpa, D., da Cunha, A., de Carmargo, B., Osiro, K., de Sousa, M. y Noronha, E. (2015). Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 105(1), 97-105.

- Haq, I., Hameed, H., Mahmood, Z. y Javed, M. (2012). Solid state fermentation for the production of α -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pakistan Journal of Botany*, *44*(1), 341-346.
- Henrissat, B. y Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical journal*, *293*(1), 781-788.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M. y Kudo, T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters*, *221*(2), 299-304.
- Janecek, Š., Svensson, B. y MacGregor, A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences*, *71*(7), 1149–1170.
- Jose, V. L., Appoorthy, T., More, R. y Arun, A. (2017). Metagenomic insights into the rumen microbial fibrolytic enzymes in Indian crossbred cattle fed finger millet straw. *AMB Express*, *40*(3), 1-11.
- Kawada, M., Fujimoto, Z., Momma, M., Takase, K. y Mizuno, H. (2003). Crystal Structure of *Bacillus subtilis* α -Amylase in Complex with Acarbose. *Journal of bacteriology* , *185*(23), 6981–6984.
- Ko, C. H., Tsai, C. H., Tu, J., Yang, B. Y., Hsieh, D. L., Jane, W. N. y Shih, T. L. (2011). Identification of *Paenibacillus* sp. 2S-6 and application of

its xylanase on biobleaching. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(2), 334-339.

Krause, D., Denman, S., Mackie, R., Morrison, M., Rae, A., Attwood, G. y McSweeney, C. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 663-693.

Laboratorio de Microscopía y Microanálisis. (2020). Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasilia. <http://Imm.unb.br/>

Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(15), 680-685.

Läufer, A. (2017). Starch Biorefinery Enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (pp. 137-152). Netherlands: Springer.

Lawton, J. (2015). Starch: Uses of Native Starch. *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*, 3(4), 274-281. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. y Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), 1-15.

Liu, J., Liu, Y., Yan, F., Jiang, Z., Yang, S. y Yan, Q. (2016). Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel type I pullulanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in

resistant starch production. *Protein Expression and Purification*, 121(1), 22-30.

Liu, X., Liu, Y., Jiang, Z., Liu, H., Yang, S. y Yan, Q. (2018). Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. *Food Chemistry*, 264(1), 310-318.

Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. *NCBI Handbook*, 1-15.

Mamo, G., y Gessesse, A. (1999). Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1), 433-438.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. y Wade, W. G. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795–799.

Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L. M. y Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación en estudio de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 415-429.

Moreira, L., Campos, M., Siqueira, P., Silva, L., Ricart, C., Martins, P. y Filho, E. (2013). Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*:

- Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology*, 60(1), 46-52.
- Mótyán, J., Gyémánt, G., Harangi, J. y Bagossi, P. (2011). Computer-aided subsite mapping of α -amylases. *Carbohydrate Research*, 346(1), 410-415.
- Nagaraja, T. (2016). Microbiology of the Rumen. *Rumenology* (pp. 39-61). Switzerland: Springer.
- Naidu, K., Maseko, S., Kruger, G. y Lin, J. (2019). Purification and characterization of α -amylase from *Paenibacillus* sp. D9 and *Escherichia coli* recombinants. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(1), 24-34.
- Nawaz, H., Waheed, R., Nawaz, M. y Shahwar, D. (2020). Physical and chemical modifications in starch structure and reactivity. *IntechOpen*, 1(1), 1-21. DOI: 10.5772/intechopen.88870
- Negi, S. y Vibha, K. (2016). Amylolytic Enzymes: Glucoamylases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 25-46). Netherlands: Elsevier.
- Neumann, A., Weimer, P. y Suen, G. (2018). A global analysis of gene expression in *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on cellulose and

soluble sugars at different growth rates. *Biotechnology for Biofuels*, 11(295), 1-17.

Nieboer, E. y Richardson, D. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 1(1), 3-26.

Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597-611.

Ogbonnaya, N., y Odiase, A. (2015). Studies on the production of alkaline alpha-amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(1), 71-75.

Osiro, K. (2015). *Identificação e caracterização do secretoma e celulosoma de um novo isolado de Clostridium thermocellum (B8) para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas*. Brasília: Universidade de Brasília.

Osman, S., Satomi, M. y Venkateswaran, K. (2006). *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 1509–1514.

Pereira, J., Giese, E. C., Moretti, M. M., Gomes, A. C., Perrone, O. M., Boscolo, M. y Martins, D. A. (2017). Effect of Metal Ions, Chemical

Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. *Enzyme Inhibitors and Activators* (pp. 1-15). São Paulo: Intechopen.

Prakash, O. y Jaiswal, N. (2010). α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 2401-2414.

Prakash, O., Jaiswal, N., y Pandey, K. (2011). Effect of Metal Ions, EDTA and Sulfhydryl Reagents on Soybean Amylase Activity. *Asian Journal of Biochemistry*, 6(3), 282-290.

Price, M., Dehal, P. y Arkin, A. (2010). FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *Plos One*, 5, 170–176.

Puniya, A. K., Singh, R. y Kamra, D. (2015). Rumen Microbiology: An Overview. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer, New Delhi.

Rajesh, T., Kim, Y. H., Choi, Y. K., Jeon, J. M., Kim, H. J., Park, S. H. y Yang, Y. H. (2013). Identification and Functional Characterization of an α -Amylase with Broad Temperature and pH Stability from *Paenibacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(1), 359-369.

- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E. y Gautieri, A. (2018). Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 1-18.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2013). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Saini, R., Singh, H., y Dahiya, A. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1865-1871.
- Salem, K., Elgharbi, E., Hlima, H. B., Perduca, M., Sayari, A. y Hmida-Sayari, A. (2020). Biochemical characterization and structural insights into the high substrate affinity of a dimeric and Ca²⁺ independent *Bacillus subtilis* α-amylase. *Biotechnology progress*, 36(4), 1-14.
- Santos, E. d. y Martins, M. L. (2003). Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1), 129-134.
- Sarian, F., Van der Kaaij, R. M., Kralj, S., Wijbenga, D. J., Binnema, D. J., van der Maarel, M. J. y Dijkhuizen, L. (2012). Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium aurum* strain B8.A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 645-654.

- Silva, L., Gomes, T., Ullah, S., Ticona, A., Hamann, P. y Noronha, E. (2019). Biochemical Properties of Carbohydrate-Active Enzymes Synthesized by *Penicillium chrysogenum* Using Corn Straw as Carbon Source. *Waste and Biomass Valorization*, 6(1), 1-12.
- Sindhu, R., Binod, P. y Pandey, A. (2016). α -Amylases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 3-24). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Singhania, R., Patel, A., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B., y Ashok, A. (2015). Industrial enzymes. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1(1), 473-496.
- Smith, A. C. y Hussey, M. A. (2005). *Gram Stain Protocols*. Fonte: American Society for Microbiology: <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>.
- Ticona, A., Ullah, S., Hamann, P., Lopes, F. y Noronha, E. (2020). *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 as a Source of Plant Cell Wall Degrading Enzymes and Its Use on Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*, 5(1), 1-13.
- Tsukaki, K., Watanabe, H., Yamamoto, T., Nishimoto, T., Chaen, H. y Fukuda, S. (2012). Purification and Characterization of Highly Branched α -Glucan-Producing Enzymes from *Paenibacillus* sp.

PP710. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(4), 721–731.

Van Beilen, J. B. y Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338-344.

Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. y Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-coverting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(3), 137-155.

Wang, L., Hatem, A., Catalyurek, U., Morrison, M. y Yu, Z. (2013). Metagenomic insights into the carbohydrate-active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows. *PLoS ONE*, 8(11), 1-11.

Wang, S. y Copeland, L. (2015). Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(1), 1081-1097.

Xu, Q., Cao, Y., Li, X., Liu, L., Qin, S., Wang, Y. y Qiao, D. (2016). Purification and characterization of a novel intracellular α -amylase with a wide variety of substrates hydrolysis and transglycosylation activity from *Paenibacillus* sp. SSG-1. *Protein Expression and Purification*, 144(1), 62-70.

Yamamoto, S. y Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104-1109.

Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y. y Joerger, R. D. (2002). 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Applied and environmental microbiology*, 68(1), 124–137.

ANEXOS

ANEXO 1. Autorización de uso de la cepa A1_50L2

ANEXO 1



AUTORIZACIÓN DE USO DE LABORATORIO

La que suscribe la presente carta de autorización informa que el Sr. Alonso Roberto Poma Ticona identificado con DNI 44179715 de nacionalidad peruana, viene realizando actividades de laboratorio e investigación desde el año 2015 a la actualidad de forma presencial y/o por acceso remoto en el Laboratorio de enzimología, del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Brasilia (UnB), Brasil.

Así mismo, hago de conocimiento que el Sr. Alonso Poma tiene autorización para utilizar la cepa *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2, la cual pertenece a la colección de bacterias ruminales del laboratorio de enzimología de la UnB para la ejecución del proyecto titulado "Caracterización enzimática de una α -amilasa producida por la bacteria termófila *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 aislada del rumen bovino".

Con el objetivo de purificar la enzima α -amilasa producida por *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2, el Sr. Alonso Poma realizará ensayos cromatográficos bajo mi supervisión en el laboratorio de enzimología de la UnB los cuales incluirán: preparación de la muestra, uso del sistema de cromatografía líquida automatizada AKTA purifier, detección de actividad α -amilasa y electroforesis.

Sin otro particular, me despido con grato aprecio y consideración.

Brasilia, 09 de septiembre del 2020

Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha
Prof. Adjunto
Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia
E-mail: enoronha@umb.br
Telefone: +55 (61) 31072952

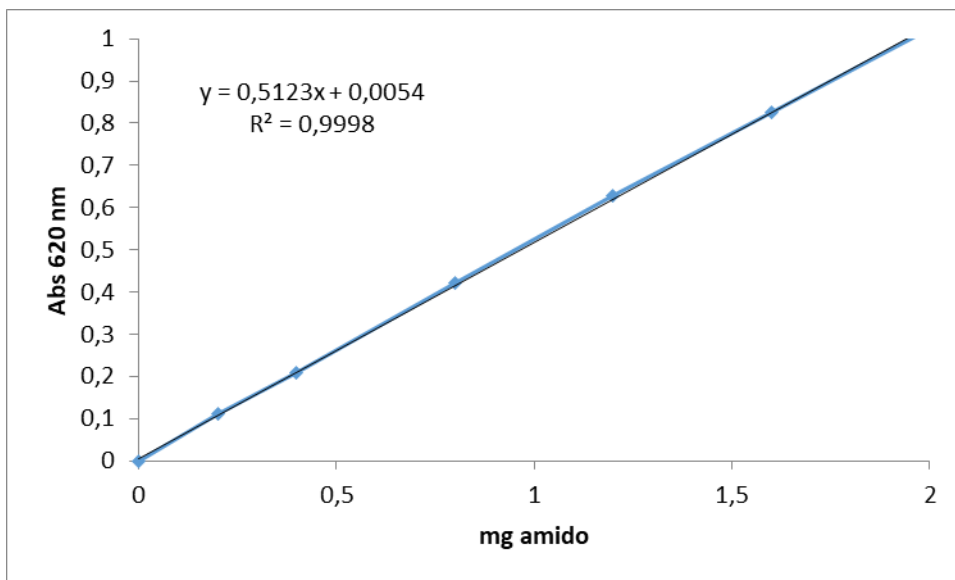
ANEXO 2. Lista de las cepas ruminales pertenecientes al cepario del laboratorio de enzimología de la UnB

Aislado	Temperatura °C	Aislado	Temperatura °C
A1_37L1	37 °C	C1_37S	37 °C
A1_37L2	37 °C	C1_37L	37 °C
A1_37L3	37 °C	C2_37S	37 °C
A1_37L4	37 °C	C2_37L1	37 °C
A1_37S1	37 °C	C2_37L2	37 °C
A1_37S2	37 °C	Cel1_37S1	37 °C
A1_37S3	37 °C	Cel1_37S2	37 °C
A1_37S4	37 °C	Cel1_37S4	37 °C
A1_37S5	37 °C	Cel1_50S3	50 °C
A2_37L4	37 °C	Cel1_50S4	50 °C
A2_37L5	37 °C	C1_60L3	60 °C
A2_37L6	37 °C	C1_60L4	50 °C
A1_50S3	50 °C	C1_60L5	50 °C
A1_50S4	50 °C	C1_60L6	50 °C
A1_50S5	50 °C	C1_60L7	50 °C
A1_50S6	50 °C	C1_60L8	60 °C
A1_50S7	50 °C	C1_60L9	60 °C
A1_50L1	50 °C	C2_60L1	60 °C
A1_50L2	50 °C	C2_60L2	60 °C
A1_50L3	50 °C		
A1_50L4	50 °C		
A1_50S2	50 °C		
A2_50L1	50 °C		
A2_50L2	50 °C		
A1_60L2	60 °C		
A1_60L4	60 °C		
A1_60L5	60 °C		

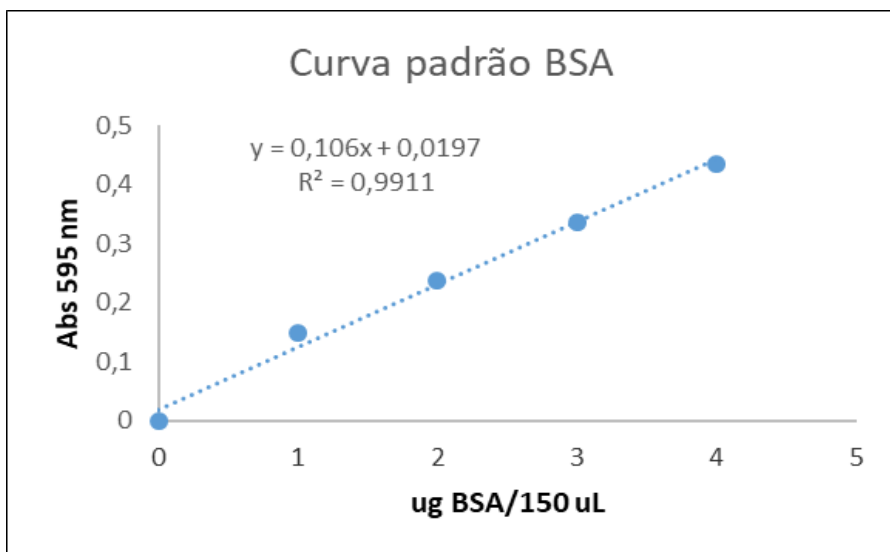
ANEXO 3. Stock de la cepa A1_50L2 en medio reductor líquido y sólido



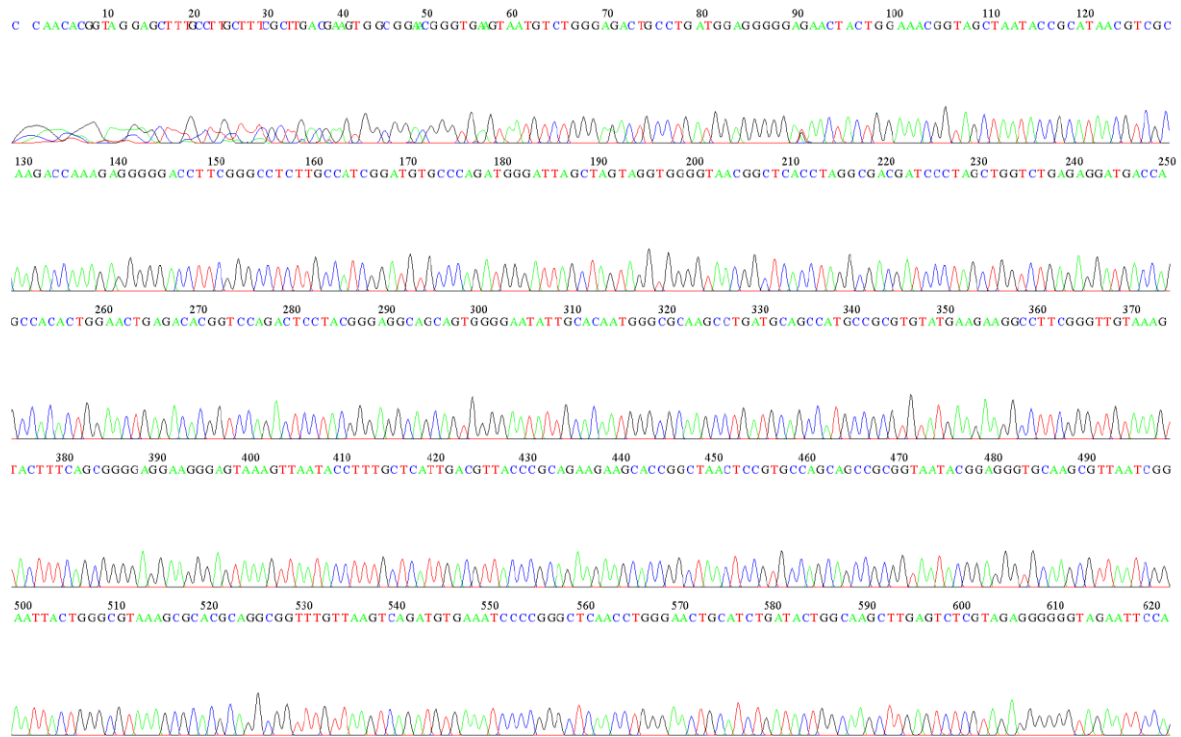
ANEXO 4. Curva de calibración con almidón para la detección de la actividad α -amilasa



ANEXO 5. Curva de calibración con ASB para la cuantificación de proteínas



ANEXO 6. Electroferograma de la secuencia ARNr 16S, usando los primers 63F y 1387R



ANEXO 7. Secuencia consenso de la cepa A1_50L2

CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCGTAAGACTGGGAGA
ACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGGATACGCAAGTCTCTCGCATGAGGGGCTTG
GGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGTTAG
AGTAACTGCTAACGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTGTTTAAGTCTGGTGTTTAATCCTGGGGCTCAA
CCCCGGGTTCGCACTGGAAACTGGGCAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTT
AGGGGTTTTGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGNGGACCCGCACAA
GCAGTGGAGTATGTGGNTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCCCCTGACCGGTGNCAGAGATGTRCCTTNTCCTTCGGGACAGGGGA
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTGACTIONTACTGTTGCCAGCAAGTAAGGTTGGGCACT
CTAGAGTGACTIONTACTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTIONTACTACAATGGCCGGTACAACG
GGAAGCGAAGGAGCGATCTGGAGCGAATCCTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGA
TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGGAATGCTAGTAATCGCGGATC
AG



Bach. Alonso Roberto Poma Ticona

TESISTA



Dr. Daladier Castillo Cotrina
Facultad de Ciencias-UNJBG
ASESOR