



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**ENZIMAS AMIOLÍTICAS DEL POZOL.  
APROXIMACIÓN PROTEÓMICA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

**JOCELIN MARARI RIZO VILLAGRANA**



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

<b>Presidente:</b>	Dra. María del Carmen Wacher Rodarte	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal:</b>	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
<b>Secretario:</b>	Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
<b>Suplente:</b>	Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar	Facultad de Química, UNAM
<b>Suplente:</b>	Dra. Gloria Díaz Ruiz	Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja** en el laboratorio C034 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México, D.F. 04510, México.

Trabajo apoyado por CONACYT, Proyecto CONACYT 49687-Z.

**Asesor:**

---

Dra. Romina Rodríguez Sanoja

**Supervisor técnico:**

---

M. en C. María Catalina Cárdenas Ascención

**Sustentante:**

---

Jocelin Marari Rizo Villagrana

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque a lo largo de mi estancia en esta Institución logre desarrollarme personal y profesionalmente, por permitirme lograr mí más grande sueño y por convertirse en mí segunda casa. Siempre estaré orgullosa de ser egresada de la máxima casa de estudios.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por sus enseñanzas, su paciencia, por guiarme a lo largo de mi estancia en el laboratorio y porque siempre me ha apoyado y alentado para lograr cumplir mis objetivos. Gracias por su amistad y consejos.

Al Departamento de Biológica Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por brindarme las facilidades para desarrollar este trabajo.

Al apoyo de CONACYT por el Proyecto 49687-Z.

## DEDICATORIA

A mis padres **Ernesto y María.** Por su cariño, apoyo, paciencia, confianza, por guiarme en la vida, porque sé que todo lo que han hecho es por nosotros y para nosotros, sus hijos. Porque al final no lo hubiera logrado sin ustedes. No existen palabras para decirles cuanto los quiero, así que este pequeño logro en mi vida es para ustedes. Me dieron más de lo que pude esperar.

A mis hermanos La vida nos unió para apoyarnos incondicionalmente, complementarnos y querernos.

**Berenice.** Eres un ser único que a pesar de las adversidades aun le sonríes a la vida, eres amorosa y has estado conmigo siempre. Lograras tus objetivos porque eres muy capaz y siempre contaras conmigo.

**Ernesto.** Eres más que un hermano para mí, gracias por las pláticas, por cuidarme, protegerme, por preocuparte por mí y por todo lo que hemos compartido juntos. Siempre serás mi pequeño hermano y espero poder ser una inspiración en tu vida para que logres todo lo que deseas.

Siempre llevaré algo de ustedes en mi persona.

A mi sobrino **Sebastián.** Tu personita ilumina mi vida, tu ingenio me asombra y tu energía me contagia. Siempre estaré para ti, tienes mi amor y cariño incondicional.

A mi familia Tíos, tías, primas, primos, abuelos (los presentes y lo que ya nos dejaron) por preocuparse siempre por mí, por el cariño y amor que me han brindado, por ser mi familia y porque estoy segura de que siempre contare con ustedes. Gracias familia.

A una persona **José**. Llevamos juntos más de 7 años, hemos pasado por muy especial momentos difíciles que han marcado nuestra relación, superando cada uno de ellos. Te doy las gracias por ser mi soporte en la vida, porque no sé si lo hubiera logrado sin ti, por estar conmigo cuando más te necesite, por ser tan paciente y por darme un motivo para ser feliz.

A mis amigos **Araceli, Carlitos, Ulises, Eduardo, Erick C., Alberto, Vicente, Karla, Mayra, Nayeli, Yaneli**. Por ser parte fundamental en mi vida, por ayudarme y apoyarme, por las tardes que compartimos, las experiencias vividas y las pláticas. Con algunos de ustedes he crecido y nos conocemos desde siempre, no importa el tiempo que pase estoy segura de que siempre tendré su amistad. Los quiero.

**Mary**. No puedo imaginar una vida en la que no estés, te agradezco el tiempo que compartes conmigo, las tardes en las que más necesite de alguien y estuviste ahí escuchándome y apoyándome. Gracias por enseñarme que no existe nada en la vida que pueda detenernos, por iluminar mi camino y por permitirme conocerte.

La vida siempre tiene algo hermoso que darnos y para mi has sido tú.

**Alejandro**. Fuiste mi primer amigo en la facultad, compartí contigo mis primeras decepciones, frustraciones, tristezas y alegrías. Tú mejor que nadie sabe lo que siento por ti y lo que eres en mi vida.

**Thalía**. Pasamos por momentos difíciles, nos unió la decepción y la tristeza, pero ahora me doy cuenta que de eso no queda nada más que nuestra amistad. Gracias por estar conmigo

siempre, por responder cada llamada, por escucharme y por prestarme tu hombro cada que lo necesite. Te quiero mucho, eres parte esencial en mi vida.

Al lab. C034

**Caty, Karina, Benjamín, Silvia, Daniel, Paola, Araceli, Laurita y Ricardo.** Por permitirme conocerlos para darme cuenta de lo admirables que son. Por las mañanas y tardes llenas de pláticas, por las convivencias fuera y dentro del laboratorio. Por los consejos, por ser más que mis compañeros y por alentarme siempre.

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

Resumen

<b>CONTENIDO</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>I</b>	Introducción	1
<b>II</b>	Antecedentes	3
<b>III</b>	Justificación	25
<b>IV</b>	Hipótesis	26
<b>V</b>	Objetivos	27
<b>VI</b>	Materiales y Métodos	28
<b>VII</b>	Resultados y discusión	37
<b>VIII</b>	Conclusiones	51
<b>IX</b>	Perspectivas	52
<b>X</b>	Apéndice	53
<b>XI</b>	Referencias	74

## ABREVIATURAS

CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1- propano sulfonato</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
BSA	Albúmina Sérica Bovina
ASB-14	<i>Amidosulfobetaina-14</i>
cm	<i>Centímetros</i>
D.O	<i>Densidad óptica</i>
DTT	Ditiotreitol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
G	Glucosa
GH	Glucósido hidrolasas
g	Gramo
IEF	Isoelectroenfoque
KDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
L	Litro
µg	Microgramo
µl	Microlitros
mA	Miliamper
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
ng	Nanogramo

nm	Nanómetros
pNP	Para-nitrofenol
pI	Punto isoeléctrico
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Volts

## RESUMEN

El pozol es una bebida de origen Maya, ácida, refrescante, no alcohólica, elaborada con maíz nixtamalizado y fermentada de forma natural. Debido a que durante la nixtamalización se reduce drásticamente la concentración de mono y disacáridos, la principal fuente fermentable que se encuentra presente es el almidón. Los estudios microbiológicos encaminados a encontrar la actividad amilolítica reportan bacterias lácticas débilmente amilolíticas.

Usando como herramienta el análisis proteómico se identificarán las  $\alpha$ -amilasas presentes en el sistema. Sin embargo, el método diseñado para la preparación de extractos proteicos requiere el uso de agentes caotrópicos, reductores y detergentes que provocan la completa desnaturalización de las proteínas. Así, el primer paso y el objetivo del trabajo fue la estandarización de una metodología que permita la recuperación de la actividad en geles SDS-PAGE y 2D y por lo tanto su identificación *in situ*, sin pasar por un cultivo previo.

Los resultados encontrados muestran que es posible recuperar la actividad de las enzimas probadas, siempre y cuando esta sea mayor a 0.17U utilizando el método de extinción del complejo yodo-almidón, 0.13U con el método de liberación de azúcares reductores y 0.0014U con el sistema Randox por cada "punto" detectado en el gel.

## I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica, que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. Se consume al sur y sureste de México [10].

La composición química de los granos del maíz depende de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra. En promedio, el contenido de proteína es del 10% y una buena parte se encuentra en el germen del grano, los lípidos constituyen el 5%, principalmente en el germen. El almidón es el principal carbohidrato (72%) y prácticamente todo está en las células del endospermo; otros carbohidratos como la sacarosa, fructosa y glucosa, constituyen entre el 1-3% [13].

La elaboración comienza con la cocción de los granos en una solución de hidróxido de calcio al 1%, posteriormente los granos se lavan con agua y se dejan remojar toda la noche, para ser molidos y obtener la masa (nixtamalización), esta se moldea en forma de bolas que se envuelven en hojas de plátano para su posterior fermentación a temperatura ambiente [10]. Durante la nixtamalización se reduce drásticamente la concentración de mono y disacáridos, por lo que la única fuente de carbono fermentable que se encuentre presente en esta bebida es el almidón.

La fermentación se lleva a cabo por una microbiota natural resultante de la contaminación del nixtamal durante el remojo y la molienda, la cual está constituida por bacterias, hongos y levaduras [18]. Las bacterias ácido lácticas son el grupo predominante durante la fermentación, y entre ellas, los géneros más abundantes y activos son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weisella* [19,20, 21].

Se ha propuesto que las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en la fermentación por ser el almidón el principal sustrato disponible. No obstante, los estudios microbiológicos encaminados a encontrar la actividad amilolíticas son muy escasos, se han limitado a los microorganismos cultivables y los que se han

llevado a cabo en bacterias lácticas muestran que éstas son débilmente amilolíticas si se comparan con otras bacterias, incluso lácticas.

Para poder explicar cómo es posible que un contenido tan bajo de azúcares puede contener una microbiota tan diversa se decidió realizar una aproximación del sistema de  $\alpha$ -amilasas que intervienen en este proceso utilizando como herramienta el análisis proteómico, ya que es una de las técnicas de más grande alcance para resolver mezclas complejas de proteínas.

La preparación de extractos proteicos para dicho estudio requiere la completa disgregación, reducción y solubilización de las proteínas, lo que permite romper interacciones moleculares y asegurar de esta forma que cada punto en el gel representa un polipéptido individual [4]. Para lograr esto se requiere el uso de agentes caotrópicos, reductores y detergentes que ocasionan la desnaturalización y, por lo tanto, la pérdida de actividad de las enzimas presentes en la masa.

Este trabajo pretende contribuir con la estandarización de una metodología que permita recuperar las propiedades nativas de las enzimas para su identificación *in situ*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Proteómica

El término proteoma fue introducido en 1994 por Wilkins y fue definido como “el estudio del conjunto completo de proteínas codificadas por un genoma”. Nos permite hacer el análisis simultáneo de una mezcla compleja de proteínas, para establecer sus propiedades funcionales y estructurales. Los estudios de proteómica proveen información detallada sobre la abundancia de proteínas, estabilidad, modificaciones post-transduccionales e interacciones proteína-proteína de un conjunto de proteínas que se expresan en un organismo [1].

Existe también el término “metaproteómica” el cual estudia el proteoma derivado de los organismos de un ecosistema. Este campo de investigación permite el estudio de los organismos que no son fácilmente cultivados en condiciones de laboratorio, así como el estudio de los organismos en su entorno natural y las interacciones que concurren entre ellos.

A diferencia de las técnicas clásicas utilizadas en bioquímica, la proteómica se basa en la separación y la identificación de muchas proteínas (en el orden de mil o más) simultáneamente. Esta incluye diversos campos de investigación:

- Identificación de las proteínas expresadas por un organismo en una condición dada (proteómica descriptiva o estructural, todas las proteínas expresadas en un momento y un contexto).
- Identificación de los cambios a nivel de expresión de proteínas asociados a cambios en las condiciones de un organismo (proteómica comparativa, cuáles proteínas cambian cuando un organismo se somete a condiciones diferentes).
- Identificación de conjuntos funcionales de proteínas, es decir, grupos de proteínas que se localizan en un mismo sitio y que operan en mutua interacción (interacciones proteína-proteína, proteómica funcional).

- Identificación de las proteínas que forman un organelo (este enfoque conduce a la elaboración de un mapa molecular de la célula).

Para poder llevar a cabo el estudio de las proteínas es necesario disponer de técnicas que permitan separarlas, identificarlas y cuantificarlas, las cuales pueden ser divididas en dos grandes campos: 1) las que utilizan técnicas de electroforesis y 2) las que utilizan cromatografía [2].

## 2.2 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fue descrita por primera vez en 1949, en la cual la separación se da una vez que un campo eléctrico es aplicado a una solución que contiene a las proteínas, para su posterior migración dependiendo de su tamaño y forma [3].

Actualmente, la separación de las proteínas en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-GE) es el método estándar para estudiar el proteoma de una célula, tejido, órgano u organismo. O'Farrell fue el primero en describirla en 1975. Los geles permiten obtener un arreglo o despliegue físico en dos dimensiones de mezclas complejas de proteínas, basándose en la combinación de dos técnicas ortogonales (es decir, que no comparten principios físicos comunes): 1) separación por carga eléctrica y 2) separación por peso molecular [2].

Previo a la separación de las proteínas es necesario la obtención de extractos proteicos. Muchos protocolos han sido estandarizados y publicados, pero éstos deben ser adaptados y optimizados para cada tipo de muestra que va a ser analizada (células de bacterias, levaduras, mamíferos, tejidos), al igual que para el tipo de proteína de interés (proteínas del citosol, de membrana, solubles o insolubles). Para poder tomar ventaja de la alta capacidad de resolución de los geles en dos dimensiones, las proteínas tienen que ser completamente desnaturalizadas, disgregadas, reducidas y solubilizadas para romper interacciones moleculares y asegurarse que cada punto en el gel representa un

polipéptido individual. Los tres pasos fundamentales en la preparación de la muestra son ruptura celular, inactivación o remoción de sustancias que pueden interferir en el análisis y solubilización de las proteínas [4].

### **2.2.1 Preparación de la muestra**

La ruptura celular puede ser llevada a cabo por lisis osmótica, lisis enzimática, por la adición de detergentes, sonicación, maceración con o sin hielo seco, homogenización, entre otros. El método elegido dependerá del tipo de muestra y pueden ser utilizados de forma individual o combinados.

Durante o después de la lisis celular, las enzimas proteolíticas, las sales, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos o proteínas de alta abundancia deben ser removidos o inactivados. Las técnicas utilizadas para la eliminación de estos componentes no pueden alterar el perfil de proteínas, no pueden introducir modificaciones sobre las proteínas (por ejemplo, no puede trabajarse en condiciones en que las proteasas endógenas sean activas y causen la proteólisis de componentes de la muestra) y el número de pasos debe ser mínimo [2, 5].

Las proteasas provocan la degradación de las proteínas, por lo que inhibidores de proteasa se añaden usualmente a la muestra. También es común la inactivación de estas por la disminución de pH o por el calentamiento en una solución que contenga SDS.

La fuerza iónica de la solución de la muestra influencia considerablemente la solubilidad de las proteínas. Por lo tanto, las sales deben ser eliminadas.

Las sales migran junto con las proteínas durante el isoelectroenfoque, estas pueden provocar un aumento en la conductividad por lo que el enfoque de las proteínas en la primera dimensión no puede llevarse a cabo hasta que los iones de las sales se hayan desplazado hasta los extremos de las tiras. Cuando hay una alta concentración de sales, algunas regiones de las proteínas no se enfocan, ocasionando distorsiones en los geles finales. La eliminación de éstas puede

hacerse por diálisis, ultrafiltración, precipitación con TCA (ácido tricloroacético) o solventes orgánicos.

El rango de concentración de sales apropiado para la primera dimensión depende del tipo de carga de muestra que se haga:

- Cuando la muestra se carga en la tira a la vez que se realiza la rehidratación, la concentración de sal debe ser inferior a 10mM.
- Cuando la muestra se aplica tras la rehidratación, la concentración puede llegar hasta 50mM.

Los polisacáridos, al igual que los ácido nucleicos, pueden interaccionar con los anfolitos de carga o con proteínas dando lugar a patrones 2-D distorsionados. Además, estas macromoléculas pueden incrementar la viscosidad de la solución y obstruir los poros de los geles de poliacrilamida. Un método común para su remoción es la precipitación de las proteínas con acetona o TCA/acetona.

Los lípidos pueden formar complejos con los detergentes lo cual reduce considerablemente la separación de las proteínas, ya que su solubilidad se ve disminuida. Su eliminación puede llevarse a cabo con precipitación con acetona o una combinación de TCA/acetona. Se ha reportado también el uso de acetonitrilo con 1% de TFA (ácido trifluoroacético), lo cual ayuda a disolver las proteínas y los lípidos de membrana.

La solubilización de las proteínas afecta la calidad del resultado final lo que determina el éxito de todo el experimento. Una vez aisladas, las proteínas en su estado nativo son a menudo insolubles. La ruptura de las interacciones involucradas en la agregación de las proteínas (puentes de hidrogeno, disulfuro, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas e iónicas), permiten la disgregación de éstas en polipéptidos individuales lo que promueve su solubilización en la solución [3, 5].

Considerando la gran diversidad de proteínas y su heterogeneidad, la solubilización de las muestras implica el uso de agentes caotrópicos (urea y/o tiourea), detergentes (CHAPS o Tritón X-100) y agentes reductores (ditiotreitól). Su uso es indispensable ya que bajo condiciones nativas, un gran parte de las proteínas existen en muchas diferentes conformaciones. Esto daría lugar a un patrón muy complejo en la electroforesis bidimensional, por lo cual no podría ser analizado. Las proteínas deben ser desnaturalizadas con la finalidad de desplegarlas en una sola conformación. Diferentes pasos de oxidación deben ser prevenidos con la adición de agentes reductores, los cuales reducen los enlaces disulfuro a grupos sulfhidrilo. Todas las proteínas, incluidas las hidrofóbicas, tienen que estar en contacto con la solución. Los agregados proteicos son muy grandes para entrar en la matriz del gel. La formación de estos se puede prevenir por la adición de altas concentraciones de urea y agentes reductores. Es necesario romper las interacciones proteína-proteína [6].

Antes del análisis proteómico es deseable reducir la complejidad de la muestra por “perfeccionamiento” o por “enriquecimiento” con las proteínas de interés. La idea fundamental del perfeccionamiento es separar la muestra en fracciones distinguibles que contengan un cierto número de moléculas. Las muestras pueden ser fraccionadas usando una variedad de métodos: precipitación, centrifugación, cromatografía líquida, filtración y sedimentación. La selección de la técnica depende de la naturaleza de la muestra que será analizada y del objetivo del estudio.

El enriquecimiento permite el incremento de la concentración de las proteínas de interés. Esto es de gran importancia en el estudio proteómico debido a que usualmente las proteínas de baja abundancia son las responsables de los procesos que se llevan a cabo en la célula [3].

### **2.2.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque**

Dependiendo de la composición de aminoácidos las proteínas pueden tener carga positiva, negativa, no tener carga (carga neta cero) o ser anfóteras, es decir, que pueden tener carga positiva y negativa.

El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH específico donde la carga neta es cero. Las proteínas están cargadas positivamente a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico y cargadas negativamente a valores de pH por arriba de su punto isoeléctrico. El isoelectroenfoque es una separación electroforética basada en esta característica bioquímica.

Básicamente, la primera dimensión se lleva a cabo con una tira, que está formada por la polimerización de monómeros de acrilamida, unidos por bis-acrilamida. Antes de su uso las tiras son rehidratadas con una solución que contiene un coctel con las proteínas a separar en el tampón de solubilización y anfolitos, que son moléculas anfóteras con un determinado punto isoeléctrico.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las moléculas cargadas negativamente (proteínas y anfolitos) se mueven a través del ánodo (positivo) y las moléculas cargadas positivamente se mueven a través del cátodo (negativo). Cuando las proteínas se encuentran alineadas de acuerdo a su punto isoeléctrico, la carga neta global es cero y por lo tanto estas son incapaces de moverse, en este momento se considera que las proteínas están focalizadas [4].

### **2.2.3 Segunda dimensión: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Después de que las proteínas han alcanzado su punto isoeléctrico, las muestras se separan de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), tal como lo describe Laemmli (1970). El SDS provoca la ruptura de las estructuras secundaria y terciaria por lo que los polipéptidos se desdobl原因. Para lograr un completo despliegue, los enlaces disulfuro entre las cisteínas deben ser reducidos, lo que se

logra con una agente reductor como el 2-mercaptoetanol o el ditioneol. Durante la electroforesis se forman micelas entre el SDS y las proteínas, que migran por el gel de acuerdo a su peso molecular.

Para la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) uno de los pasos críticos es el de equilibrio, el cual se lleva a cabo en dos etapas: (1) con una solución de equilibrio que contiene DTT, que permite mantener un ambiente reductor; y (2) con una solución de equilibrio que contiene iodoacetamida, para reducir los grupos tiol y prevenir su re-oxidación durante la electroforesis [7].

Ya que estos dos parámetros no están relacionados, es posible obtener una distribución uniforme de la proteína a través del gel bidimensional. El mapa resultante puede ser considerado como la huella digital de las proteínas de la muestra [8].

#### **2.2.4 Detección de proteínas**

Después de la separación, las proteínas deben ser visualizadas, ya sea por métodos específicos o universales de tinción. Las tinciones más comúnmente usados son: azul de Coomassie, azul de Coomassie coloidal y nitrato de plata, cada una con diferente sensibilidad: 50, 10 y 0.5 ng de proteína respectivamente. Las propiedades más importantes de estos métodos son su alta sensibilidad (bajo límite de detección), reproducibilidad, compatibilidad con espectrometría de masas y baja toxicidad [4, 6].

### **2.3 EL POZOL**

#### **Descripción**

El pozol del náhuatl *pozolli* que significa espumoso, es una bebida de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica hecha a base de maíz nixtamalizado. Es consumido por varios grupos étnicos del sur y sureste de México, como los chontales y choles de Tabasco; los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana

Roo; los lacandones, tzotziles o chamulas y mames de Chiapas, y los zapotecos de Oaxaca [9].

### **Elaboración**

Para la elaboración del pozol, se pueden utilizar tres tipos de maíz: blanco, amarillo y negro. Generalmente este maíz debe ser maduro ya que el uso de un maíz tierno requiere mayor cantidad de cal para eliminar el hollejo durante la cocción, lo cual modifica el sabor y resulta desfavorable desde el punto de vista económico. El pozol preparado con maíz tierno se acidifica más rápidamente provocando modificaciones sensoriales en el producto final [10].

El proceso de elaboración empieza con la limpieza del maíz para eliminar el material extraño y granos podridos que son de mal aspecto en el pozol. Para ello, comúnmente se agrega agua al maíz crudo, se deja reposar unos minutos y se elimina todo lo que flota, que es maíz picado y cascarillas. Después del lavado los granos de maíz se cuecen en agua con cal para lograr la separación del hollejo (o cascarilla) del grano, este paso es conocido como nixtamalización y termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos, el tiempo de cocción varía entre 60 y 120 minutos. Posteriormente el maíz nixtamalizado es lavado en agua para eliminar la cal y la cascarilla, hasta que el agua de lavado quede libre de turbiedad.

Existen dos variantes de pozol: el indígena y el mestizo. La operación que representa la principal diferencia entre estos dos tipos de pozol es la segunda cocción o “reventado” que llevan a cabo los productores mestizos. Esta operación consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz revienta, el tiempo de cocción varía entre 3 y 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol, por lo general esta operación consiste en una ebullición vigorosa durante la primera hora, seguida de un hervor lento el resto del tiempo y tiene como finalidad reducir la cantidad de sedimentos sólidos presentes en la bebida cuando la masa es suspendida en agua [11].

Una vez que el maíz ha sido lavado se remoja durante toda la noche y su objetivo es aumentar la retención de humedad, para evitar que el maíz se seque durante la molienda, que es el paso siguiente para obtener la masa, la cual se moldea en forma de bolas que pueden pesar desde 15 gramos hasta un 1kg. Estas se envuelven en hojas de plátano, para su posterior fermentación a temperatura ambiente. La fermentación puede durar horas o hasta semanas en función del gusto de la gente. Una vez que la masa ha fermentado se suspende en agua y se obtiene la bebida, a la cual se le puede adicionar sal, azúcar, canela, miel, cacao o chiles secos [10, 12].

### **Modificaciones durante la elaboración del pozol**

El maíz (*Zea mays*) es un cereal originario de Mesoamérica, usado para producir forraje y como base para la fabricación de una gran cantidad de alimentos. Su composición depende de la variedad de maíz, el ambiente y las condiciones de siembra.

En promedio el contenido de proteína del maíz es del 10% y gran parte de esta se encuentra en el germen del grano. No obstante, tanto el endospermo como el pericarpio llegan a tener hasta 9% de proteínas, clasificadas en cuatro tipos de acuerdo a su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones de sales), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y gluteinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas). En el maíz las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo y han recibido el nombre de zeinas, mientras que las gluteinas se encuentran en la matriz proteica de esta misma estructura; ambas proteínas constituyen cerca del 90% de las proteínas del grano de maíz completo. Mientras que el germen está compuesto casi en su totalidad por las albúminas y las globulinas. En cuanto al contenido de lípidos, el grano de maíz contiene alrededor del 5% principalmente en el germen. El contenido de los ácidos grasos saturados, como el palmítico y el esteárico, es relativamente bajo en comparación con los ácidos grasos no saturados, como el oleico y el linoleico, los cuales representan la mayoría del total de los lípidos contenidos en el grano de maíz.

En relación a los carbohidratos presentes el más abundante es el almidón, el cual representa en promedio 72% y prácticamente todo está presente en las células del endospermo, este almidón contiene aproximadamente 27% de amilosa y 73% de amilopectina.

En el germen del grano se encuentra el 76% de los minerales, probablemente porque son esenciales para el crecimiento del embrión, el componente inorgánico más abundante es el fósforo. El azufre, que es el cuarto más abundante en el grano, está contenido en forma orgánica como parte de los aminoácidos metionina y cisteína [13].

Durante la nixtamalización, proceso que involucra una temperatura relativamente elevada y valores de pH alcalinos ( $\approx 12$ ), se facilitan diversas transformaciones, entre las que se encuentran la degradación del pericarpio por lo que hay pérdida de celulosa, hemicelulosa y de proteínas solubles (principalmente albúminas y globulinas de bajo peso molecular que se encuentran en el germen) [13].

Después de la nixtamalización, la concentración de mono y disacáridos se reducen considerablemente, quedando una concentración de 0.1 a 0.7 g/100 g de masa seca, lo que provoca que el sistema quede conformado por el almidón como única fuente de carbono para llevar a cabo la fermentación (alrededor del 99%) [14]. Los lípidos del grano del maíz disminuyen de forma importante, hasta 3.4% debido probablemente a la pérdida del pericarpio [13].

Por otro lado, se ha observado que al final de la fermentación el contenido de proteína cruda, niacina, riboflavina y triptófano es mayor que el que se encuentra en el maíz empleado en su elaboración, debido a la fijación de  $N_2$  atmosférico que llevan a cabo *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes* [9].

## 2.4 Almidón

### Composición

Químicamente, el almidón es un polímero de glucosas unidas una a otra a través del oxígeno del C1, a esta unión se le conoce como enlace glucosídico. Al final de la cadena se encuentra un grupo aldehído que forma el extremo reductor.

En el almidón se encuentran presentes dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polisacárido lineal, cuyas moléculas de glucosas están unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, formando cadenas lineales largas (Figura 1), en el espacio adquiere una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa.

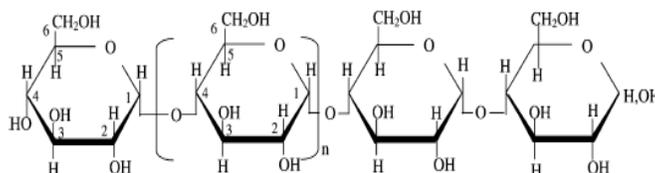


Figura 1. Estructura química de la amilosa.

La amilopectina tiene una estructura muy ramificada que le da a la molécula una forma muy similar a la de un árbol, sus cadenas son cortas y están unidas por enlaces alfa-1,4 con puntos de ramificación alfa -1,6 (Figura 2). La proporción de ramificaciones es una propiedad importante del sustrato dado que las enzimas hidrolizan los diferentes sustratos con especificidades diferentes. El contenido de amilosa y amilopectina varía con la fuente de almidón. El número promedio de puntos de ramificación en la amilopectina es de 5% pero varía con respecto a su origen. La molécula contiene aproximadamente 2 000 000 unidades de glucosa, lo que la convierte en una de las más largas en la naturaleza.

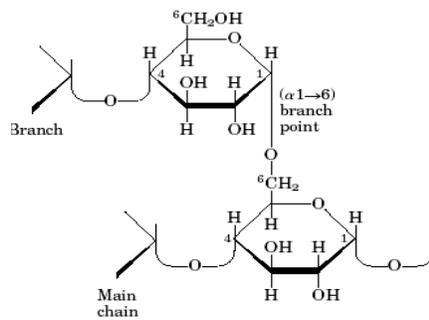


Figura 2. Estructura química de la amilopectina.

En términos generales, los almidones contienen aproximadamente 17-27% de amilosa, y el resto de amilopectina, la concentración relativa de estos dos polímeros está regida por factores genéticos típicos de cada cereal. Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades sensoriales y reológicas de los alimentos, principalmente mediante su capacidad de hidratación y gelatinización.

El almidón se organiza en regiones amorfas y cristalinas, en los almidones provenientes de tubérculos y raíces, las regiones cristalinas están solo compuestas por amilopectina, mientras que la amilosa está presente en regiones amorfas. En almidones de cereales, la amilopectina es el componente más importante de las zonas cristalinas [14,15].

## 2.5 Microbiología del pozol

Los primeros estudios microbiológicos del pozol fueron realizados por Salinas (1958), quien logró aislar e identificar dos especies bacterianas: *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*. Posteriormente Ulloa (1974) estudió la sucesión de la microbiota en muestras de pozol de Tabasco, aislando e identificando mohos y levaduras presentes en cada etapa de la elaboración y fermentación, observó que estos microorganismos aparecen en el pozol cuando la superficie se va secando y su pH va disminuyendo. La tabla 1 muestra los microorganismos que reportó.

Tabla 1. Microorganismos aislados del pozol [9].

Bacterias	Levaduras	Mohos
<i>Achromobacter pozolis</i>	<i>Candida quilliermondii</i>	<i>Alternaria tenuis</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Agrobacterium azotophilum</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Aureobasidium pullalans</i>
<i>Escherichia coli</i> var. <i>neopolitana</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Pseudomonas mexicana</i>	<i>Hansenula fabiani</i>	<i>Epicoccum</i> sp.
	<i>Kluyveromyces fragalis</i>	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Mucor racemosus</i>
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Penicillium claviforme</i>
		<i>Penicillium expansum</i>
		<i>Penicillium italicum</i>
		<i>Penicillium lanoso-viride</i>

Actualmente se sabe que la fermentación del pozol se lleva a cabo por una microbiota natural resultante de la contaminación del nixtamal durante el remojo y la molienda, la cual está constituida por bacterias, hongos y levaduras. Al utilizar técnicas tradicionales de cultivo, en muestras de pozol del estado de Chiapas, se encontró que entre las bacterias el grupo principal es el de las ácido lácticas ( $10^8$  UFC/ml), y entre éstas, *Lecuconostoc* ssp. es el microorganismo predominante (23 de 46 cepas) pero además se encontró, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* [16,17].

Debido a que los métodos tradicionales de cultivo son generalmente fastidiosos, tardados y están limitados a la identificación de los microorganismos cultivables, Ampe *et al.*, (1999) evaluaron la abundancia de la población microbiana activa mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S en muestras de pozol mestizo del estado de Villahermosa, Tabasco a dos tiempos de fermentación. Los resultados mostraron que más del 90% de la población activa son las bacterias ácido lácticas, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser

dominantes en las primeras etapas de las fermentación (12 horas), mientras que el género *Lactobacillus* predomina al final (5 días).

En una muestra procedente del mismo estado fermentada por 5 días, se estudió la distribución de los microorganismos con métodos tradicionales de cultivo, los resultados mostraron que la concentración de microorganismo es alta (9 a 10 UFC/g masa) y es cinco veces mayor en la periferia de la masa donde hay una importante población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, mientras que en el centro el número de hongos y levaduras decreció hasta niveles no detectables. La tabla 2 muestra los microorganismos aislados y el conteo de cada uno de ellos en 3 partes diferentes de la masa [19].

Tabla 2. Microorganismos aislados con métodos tradicionales de cultivo en una muestra de pozol del estado de Villahermosa, Tabasco fermentada por 5 días [19].

Organismo	No. de células		
	(log UFC·g[peso seco] <sup>-1</sup> )		
	Periferia	Intermedio	Centro
Microbiota total	9.79	9.15	9.14
Bacterias no ácido lácticas	8.47	5.73	5.72
Bacterias ácido lácticas	8.82	8.99	8.89
<i>Streptococcus, Lactococcus</i>	8.63	7.78	8.32
Bacteria ácido lácticas amilolíticas	8.69	8.71	8.72
<i>Leuconostoc</i>	8.81	6.45	5.12
Enterobacteria	7.80	5.91	3.88
<i>Enterococcus</i>	<4	<4	<4
Anaeróbicas estrictas fermentadores de lactato	<4	<4	<4
Levaduras	7.82	6.08	<4
Hongos	6.85	5.34	<4

Simultáneamente, la misma muestra fue analizada con métodos independientes de cultivo. La cuantificación del RNAr 16S mostró que el género *Leuconostoc* representa casi el 7% de la microbiota activa en la periferia de la bola del pozol y de 3 a 4% dentro de esta. Por el contrario, ninguno miembro del género *Lactococcus* fue detectado en la periferia, pero si en el interior (1.5%). Los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos miembros del género *Leuconostoc* constituyen alrededor de 25 y 50% del total de la microbiota activa en la periferia y en el centro, respectivamente. Probablemente más del 50% de los microorganismos activos pertenezcan a los géneros *Lactobacillus* y *Weissella*. Ningún miembro del género *Pediococcus* se encontró en las muestras.

El estudio de la huella de la comunidad microbiana con la técnica DGGE permitió la identificación de *Acetobacter* sp.(100% de homología con *Acetobacter aceti*), *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus bovis*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus pentosus*. Tanto los métodos dependientes e independientes de cultivo mostraron que las bacterias ácido lácticas son el grupo predominante en todas las muestras de pozol [19].

Al determinar la diversidad de bacterias ácido láctica en una muestra de pozol indígena de San Cristóbal de las Casas, Chiapas a las pocas horas de fermentación (8-10 horas) mediante la secuencia de una biblioteca de clones de una región del gen ribosomal 16S, se identificó que *Lactococcus lactis* fue el organismo más abundante, seguido de *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus plantarum*. Se detectaron nuevas bacterias lácticas que no habían sido reportadas en este alimento, *Lactobacillus delbruekii*, *Streptococcus suis* y *Clostridium* sp.[20].

Con la finalidad de demostrar el papel de la variedad de microorganismos que incluyen: hongos, levaduras, bacterias no ácido lácticas y particularmente las bacterias ácido lácticas en el pozol, Ben Omar y Ampe (2000) estudiaron muestras con 4, 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación por técnicas tradicionales de cultivo y

técnicas moleculares. La concentración total de microorganismos inicial fue alta (aproximadamente  $10^9$  a  $10^{10}$  ufc/ g) e incrementó durante la fermentación, observándose un comportamiento similar con los hongos y levaduras, que alcanzaron una concentración máxima de  $10^8$  ufc/g a las 24 horas y a las 48 horas respectivamente. Las huellas de la comunidad bacteriana permite identificar a *Streptococcus* como el principal grupo activo de la población del pozol corroborándose lo encontrado por Ampe *et al.*, (1999), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* que ya habían sido reportados previamente en el mismo trabajo y *Enterococcus sacharolyticus*, *Bifidobacterium minimum* y *Lactobacillus delbrueckii* que no habían sido detectadas. Dentro de las bacterias no ácido lácticas reportadas en este estudio se identificaron *Exiguobacterium aurantiacum* y *Oxalophagus oxalicus*. Con los resultados obtenidos se pueden distinguir tres etapas en el proceso de fermentación. La primera etapa se caracterizó por una microbiota inicial elevada, probablemente por la contaminación del nixtamal durante la molienda, Durante la segunda etapa (24 a 48 h) se desarrollaron bacterias ácido lácticas heterofermentativas observándose un incremento hasta las 48 h. La última etapa se definió por el decremento de la concentración de estas bacterias y por el crecimiento de bacterias ácido lácticas homofermentativas, siendo capaces de crecer a concentraciones elevadas de ácido láctico y a un pH por debajo de 4.

Además de las bacterias ácido lácticas, en el pozol se han identificado otras especies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Bacillus mycodies* y *Bacillus lentus*. Así como levaduras *Candida guilliermondii var. guilliermondii*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debariomyces hansenii* y *Kluyveromyces lactis var. lactics*, al igual que hongos como *Phoma glomeratta*, *Phoma fimeti*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium fellatanum* [11,22].

## 2.6 MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD AMILOLÍTICA EN EL POZOL

La presencia de microorganismos amilolíticos en el pozol es muy importante ya que, siendo el almidón el principal sustrato para que se lleve a cabo la fermentación, son ellos los responsables de hidrolizarlo y de liberar azúcares solubles, que serían entonces utilizados por los microorganismos no amilolíticos como sustratos para su crecimiento.

La mayoría de las bacterias ácido lácticas y el 50% de las levaduras aisladas por Nuraida *et al.*, (1995) hidrolizaron el almidón en medio sólido y solo algunas levaduras lograron hacerlo en medio líquido, mientras que las cepas de *Lactobacillus fermentum* muestran una degradación eficiente del almidón soluble, sugiriendo un papel importante de este microorganismo en la fermentación [21].

Díaz-Ruiz *et al.*, (2003) encontraron que la cuenta inicial de bacterias lácticas amilolíticas es alta (4.5 log ufc/g de masa seca) y que aumenta hasta 8.4 log ufc/g de masa seca durante las primeras 24 horas manteniéndose constante hasta las 72 horas (8.7 log ufc/g masa seca), corroborándose su importancia en la fermentación del pozol, principalmente en las primeras 24 horas, cuando se presenta un mayor número de estas bacterias. En este estudio se aislaron un total de 257 colonias de las cuales solo 40 presentaron halo de actividad amilolítica. Se seleccionaron cuatro especies como las más amilolíticas: *Streptococcus bovis*, que además se encontró como la especie predominante durante la fermentación, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

## 2.7 Alfa-amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa) son un amplio grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces alfa-1,4-glucosídicos del almidón, pertenecen a la familia 13 de las glucósido hidrolasas (GH13). Entre las alfa-amilasas, las enzimas bacterianas son las que presentan mayor diversidad en cuanto a sus características físico-químicas. Las más notables son su temperatura y pH óptimo

de actividad, que van desde aproximadamente 25°C a 90°C y de 1 hasta 11.5 respectivamente [24].

Las características de la familia de las alfa-amilasas son:

- Actúan hidrolizando los enlaces glucosídicos alfa-1,4; los productos de esta hidrólisis son mono u oligosacáridos de longitud variable y dextrinas límite.
- Posee una estructura  $(\beta / \alpha)_8$  o barril TIM que contiene los residuos del sitio catalítico.
- Presenta cuatro regiones conservadas en su secuencia primaria, algunos de estos aminoácidos forman el sitio catalítico.

Las amilasas tienen una estructura tridimensional capaz de unirse al sustrato y por la acción catalítica, grupos muy específicos promueven la rotura de los enlaces glucosídicos [25].

Son proteínas multidominio (Figura 3), el dominio catalítico A es el más grande, presenta una estructura típica de barril  $(\beta / \alpha)_8$  o TIM, denominado así ya que fue encontrado originalmente en la triosafosfato isomerasa del músculo de pollo. En la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas este dominio se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, otros miembros de la familia tienen un dominio distinto, dominio N, precediendo al dominio catalítico. El papel del dominio N es incierto todavía y probablemente no es estructuralmente idéntico en todas las enzimas [26].

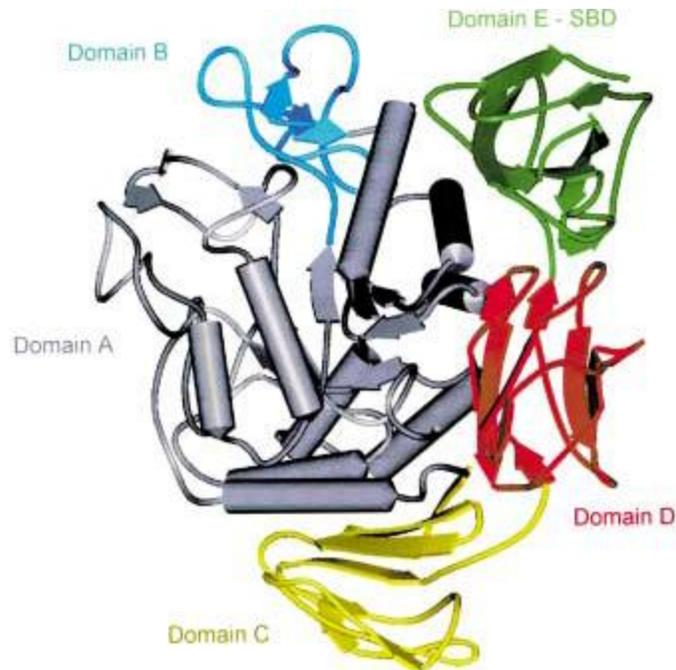


Figura 3. Estructura correspondiente a un ciclodextringlucosil transferasa (CGTasa), la cual contiene los dominios A, B, C, D y E [27].

Existen segmentos que conectan las láminas  $\beta$  con las hélices adyacentes del barril ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub>, los cuales generalmente llevan residuos de aminoácidos del sitio activo; algunos de estos segmentos pueden ser lo suficientemente largos como para ser considerados como dominios. Así, en muchos casos donde la estructura ha sido determinada por cristalografía, un largo sitio entre la tercera lámina  $\beta$  y la tercera hélice parece ser un dominio, el dominio B, que tiene una estructura irregular que varía de enzima a enzima [26].

Posterior al barril ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> se encuentra presente el dominio C, el cual está formado por láminas  $\beta$  unidas al dominio A por una cadena polipeptídica simple. Tiene un plegamiento de  $\beta$ -sandwich y parece ser un dominio independiente que ayuda a estabilizar el dominio A. El sitio activo de la alfa amilasa se encuentra en una hendidura situada entre el extremo carboxilo del dominio A y B. El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se ubica entre los dominios A y B y se sabe que es esencial para la estabilidad y actividad enzimática [28].

Finalmente, un grupo de enzimas pertenecientes a las glucósido hidrolasas contienen uno o dos dominios adicionales en el carbono terminal después del dominio C, los cuales presentan forma de láminas- $\beta$ , y son conocidos como dominios D y E. Si las enzimas poseen ambos dominios D y E, normalmente no contienen el dominio N, y entonces son proteínas de cinco dominios, que poseen el barril catalítico  $(\beta / \alpha)_8$  además de los dominios B, C, D y E [27].

### **Clasificación de las $\alpha$ -amilasas**

Existe una gran diversidad de enzimas capaces de hidrolizar las uniones glicosídicas (GHs) de diferentes polisacáridos como lo son el xilano, celulosa, quitina, etc. La International Union of Biochemistry (IUB-MB) clasificó a la enzimas con base a su especificidad hacia el sustrato y ocasionalmente por su mecanismo molecular, el cual puede ser de retención o inversión de la configuración del carbono anomérico del producto. Debido a la gran variedad que se presenta en esta clasificación se propuso un sistema basándose en la secuencia de aminoácidos la cual abarca hasta el momento 100 familias de GHs (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) y plantea que al haber una relación entre la secuencia y las similitudes de plegamiento, las características estructurales de las enzimas pueden mostrarse todavía mejor haciendo comparación con la especificidad [29].

Debido a que la estructura de las proteínas está mejor conservada que sus secuencias de aminoácidos, varias familias se han agrupado en clanes que también son conocidas como superfamilias [29]. La familia de las  $\alpha$ -amilasas abarca cerca de 30 diferentes especificidades (Tabla 3) y junto con las familias GH 70 y GH 77 comparten la estructura catalítica de barril  $(\beta/\alpha)_8$ , por lo que forman el clan GH-H [30].

Tabla 3. Enzimas pertenecientes a la familia 13 y sus actividades conocidas [30].

Número EC	Enzima	Clase	Estructura 3D conocida
3.2.1.1	$\alpha$ -amilasa	Hidrolasa	X
3.2.1.10	Oligo- $\alpha$ -glucosidasa		X
3.2.1.20	$\alpha$ -glucosidasa		
3.2.1.41	Pululanasa		
3.2.1.54	Ciclomaltodextrinasa		X
3.2.1.60	Maltotetrosa hidrolasa		X
3.2.1.68	Isoamilasa		X
3.2.1.70	Glucodextranasa		
3.2.1.93	Trehalosa-6-fosfato hidrolasa		
3.2.1.98	Maltohexaosa hidrolasa		X
3.2.1.133	Amilasa maltogénica		X
3.2.1.135	Neopululanasa		X
2.4.1.4	Amilosacarasa	Transferasas	X
2.4.1.7	Sacarosa fosforilasa		X
2.4.1.18	Enzima glucano ramificante		X
2.4.1.19	Ciclomaltodextrin glucanotransferasa		X
5.4.99.11	Isomaltulosa sintasa	Isomerasas	X
5.4.99.16	Trehalosa sintasa		

### Mecanismo de acción

La hidrólisis enzimática de los enlaces glucosídicos se lleva a cabo por catálisis ácida, la cual requiere dos residuos: un donador de protón y un nucleófilo o base. Esta hidrólisis se realiza a través de dos mecanismos principales, los cuales dan un producto que retiene o invierte la configuración del carbono anomérico [31].

El mecanismo aceptado para la familia de las  $\alpha$ -amilasas es el de la retención por doble desplazamiento (Figura 4), el cual involucra dos residuos catalíticos en el sitio activo: un ácido glutámico como el donador de protones y un aspartato como el nucleófilo.

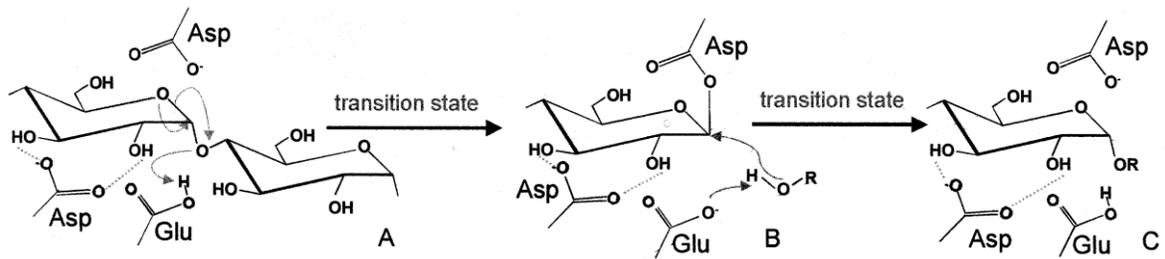


Figura 4. Mecanismo de doble desplazamiento empleado por las enzimas de la familia de las  $\alpha$ -amilasas [15].

El mecanismo consta de cinco pasos: (i) Una vez que el sustrato se ha unido al sitio activo, el ácido glutámico dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico entre las dos moléculas de glucosa en los subsitios -1 y +1, mientras que el aspartato ataca al C1 de la glucosa en subsitio +1. (ii) Se establece un estado de transición seguido por la formación de un intermediario covalente. (iii) La molécula de glucosa protonada en el subsitio +1 deja el sitio activo, mientras que una molécula de agua o una nueva molécula de glucosa se mueve dentro del sitio activo y ataca el enlace covalente entre la glucosa del subsitio -1 y el aspartato. (iv) Se forma nuevamente un estado de transición. (v) El glutamato acepta un hidrógeno de la molécula de agua o de la nueva glucosa entrante en el subsitio +1, se forma un nuevo grupo hidroxilo en el C1 de la glucosa del subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre las glucosas del subsitio -1 y +1 (transglucosilación) [15].

### III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios encaminados a describir el sistema de fermentación en el pozol se han limitado a los microorganismos cultivables. Se ha logrado aislar e identificar microorganismos con actividad amilolítica en el pozol, sin embargo, sus amilasas están asociadas a la célula y son débilmente amilolíticas. Con la finalidad de elucidar la cinética de fermentación, se planteó estudiar las  $\alpha$ -amilasas presentes a partir del metaproteoma del sistema, lo cual nos permitiría identificarlas *in situ*, sin requerir de un cultivo.

La extracción de las proteínas presentes en el pozol requiere el uso de agentes caotrópicos (detergentes o sales) que ocasionan la desnaturalización y por lo tanto la pérdida de actividad de las enzimas presentes en la masa. La identificación de las  $\alpha$ -amilasas requiere un método que permita recuperar sus propiedades nativas para su identificación *in situ*. Así, usando como control positivo  $\alpha$ -amilasas comerciales y una  $\alpha$ -amilasa previamente identificada de un microorganismo presente en fermentaciones vegetales (*L. amylovorus*), se buscarán las condiciones apropiadas para recuperar la actividad de las amilasas para posteriormente probarlas en la muestras de pozol.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Si las enzimas pierden su actividad por las condiciones fisicoquímicas necesarias para la focalización y segunda dimensión en geles SDS-PAGE y que involucran el uso de agentes caotrópicos, reductores y detergentes, entonces éstas lograrán recuperar su actividad cuando los agentes causantes de la desnaturalización o inactivación sean eliminados del medio y se encuentren en condiciones adecuadas de pH, temperatura y osmolaridad.

## V. OBJETIVO

### General

Diseñar un método que permita recuperar e identificar la actividad amilolítica *in situ*, tanto en geles en 1D como en 2D, usando como controles amilasas comerciales y la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*.

### Particulares

- \* Establecer la cinética de crecimiento y de producción de la alfa-amilasa de *L. amylovorus*.
- \* Establecer la concentración inicial adecuada de las enzimas comerciales (*B. licheniformis* y *B. subtilis*).
- \* Validar la metodología que permita la renaturalización de proteínas en geles SDS-PAGE.
- \* Establecer la metodología que permita la recuperación de la actividad amilolítica de las enzimas control después de un tratamiento con el buffer de hidratación utilizado para la 2ª dimensión (Urea, tiourea, CHAPS, ASB 14, DTT y anfolitos).
- \* Recuperar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa presente en el sobrenadante del cultivo de *L. amylovorus* después del tratamiento con el buffer de extracción, precipitación y disolución en el buffer de hidratación.
- \* Validar la metodología de extracción y renaturalización de proteínas del pozol usando como control interno la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Amilasas comerciales

Con las amilasas comerciales de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Sigma) se preparó una solución stock a una concentración de 10 mg proteína/ml en agua. Esta solución se manejó a 4°C. La actividad enzimática del stock se estimó por el método yodo-yoduro sobre una dilución 1:100. Finalmente los stocks se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 4. Características de las amilasas comerciales

Microorganismo	Características
<i>Bacillus licheniformis</i>	Temperatura máxima de actividad 90°C pH de actividad 5-9 pH óptimo 7-9 pH al cual la enzima es estable 7-10
<i>Bacillus subtilis</i>	Temperatura óptima 50-70°C pH de actividad 5.5-10 pH óptimo 5-8 pH a la cual la enzima es estable 5-9

### 6.2 *Lactobacillus amylovorus*

*Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4540 fue donada por la Agriculture Research Service Culture Collection, U.S. Department of Agriculture, Peoria Ill. Las cepas se conservaron almacenadas a una temperatura de -70°C en glicerol al 40%.

- Activación de la cepa

1. *L. amylovorus*, se inoculó al 5% en 5 ml de medio MRS con almidón al 2% (Ver apéndice I) a partir de un glicerol de almacenamiento. Las células se incubaron por 24 horas, sin agitación, a una temperatura de 29°C.
2. La cepa se re-inoculó al 3% en caldo MRS-almidón al 2% y se dejó crecer por 18 horas bajo las mismas condiciones. Finalmente se inocularon 5 ml de medio MRS-almidón al 1% con el cultivo previo para estimar el tiempo adecuado de producción de la amilasa.

- Estimación del tiempo de cosecha

Para determinar el tiempo óptimo de la producción de la amilasa, la cepa previamente activada se inoculó al 1% en 18 tubos de ensayo con 5 ml de medio MRS-almidón al 2%. Los tubos se incubaron a 29°C, a las 4, 8, 12, 16 y 20 horas se determinó el crecimiento por turbidez a 600nm. Por otro lado, a los tiempos indicados se tomó 1ml de muestra la cual fue colocada en un tubo eppendorf y se centrifugó a 7000rpm a 4°C durante 15 minutos. Al sobrenadante recuperado se le determinó actividad por el método yodo-yoduro (Ver apéndice I). Con los valores obtenidos se realizó una curva de crecimiento y actividad enzimática respecto al tiempo.

- Producción de la amilasa

Una vez determinado el tiempo al cual *L. amylovorus* presenta la mayor actividad el bacilo se creció en medio MRS con almidón al 2% a 29°C durante 16 horas. La enzima se recuperó del sobrenadante centrifugando el cultivo a 7000rpm a 4°C durante 15 minutos.

Con la finalidad de determinar la mínima actividad que puede ser detectada en un zimograma, la amilasa de *L. amylovorus* obtenida a las 16 horas se concentró por vacío en un speed vac (Radiant cover RC110B) 2, 3, 4 y 17 veces.

### 6.3 Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras obtenidas se utilizó el método de microensayos de Bradford (Bio-Rad) usando como referencia albúmina sérica bovina (BSA). Este ensayo involucra la adición de un colorante, el azul de Coomassie brillante G-250 que existe en dos formas una azul y la otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul formando un complejo proteína-colorante, el cual es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. Las proteínas tienen una absorbancia máxima de 465nm esta cambia a 595nm cuando el colorante se une a los aminoácidos básicos y ácidos de las proteínas. Las sustancias que interfieren en la medición son detergentes y soluciones básicas (Ver apéndice I).

### 6.4 Actividad amilolítica

#### a. Yodo-yoduro

El sustrato utilizado fue almidón soluble de papa (Prolabo) el cual forma un complejo azul en presencia del reactivo yodo-yoduro al 4% que absorbe a 620nm: el yodo se coloca al interior de la hélice de la amilosa, cuando la  $\alpha$ -amilasa comienza a hidrolizar el almidón, la hélice se desintegra y por lo tanto el color producido por el complejo almidón-yodo va disminuyendo [33].

El ensayo se realizó en condiciones de pH y temperatura óptimos para cada muestra, pH 7 a 90°C para la amilasa de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, pH 5 a 63°C para la amilasa de *L. amylovorus* y pH 3.5, 4, 4.5 y 5 a 36 y 50°C para las muestras de pozol.

En el apéndice I se describe el ensayo.

### b. Actividad amilolítica por Randox

Es un método colorimétrico, que utiliza etilideno p-nitrofenil-maltoheptaósido bloqueado como sustrato. El indicador de la enzima glucosidasa sirve para liberar el p-nitrofenol, que también se emplea en el método. La glucosa terminal del sustrato esta químicamente bloqueada para impedir su rompimiento por las enzimas indicadoras (Figura 5). Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Ver apéndice I).

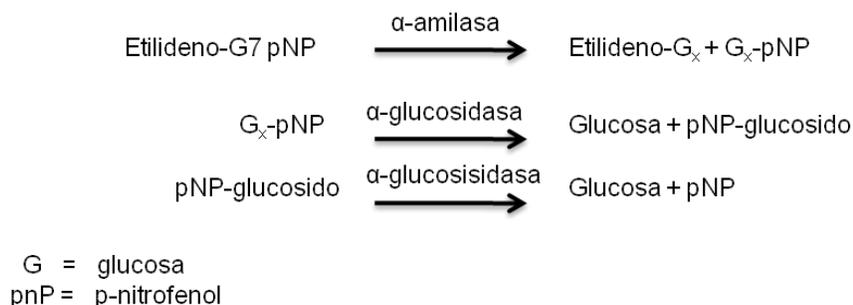


Figura 5. Esquema de la reacción para la determinación de la actividad amilolítica por el método de Randox.

### c. Cuantificación de azúcares reductores liberados

Permite medir el incremento de los azúcares reductores que se forman por la hidrólisis enzimática del almidón soluble de papa (Prolabo). Los azúcares liberados se cuantificaron según el método de Miller (1959), el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicilato cuando la temperatura se eleva en medio básico. El producto de la reacción es de color naranja-amarillento y posee un máximo de absorbancia a 575nm.

El ensayo se realizó en condiciones de pH y temperatura óptimos para cada muestra, pH 5 a 63°C para la amilasa *L. amylovorus* y pH 3.5, 4, 4.5 y 5 a 36°C y 50°C para las muestras de pozol (Ver apéndice I).

## 6.5 Medición del pH

Se midió en un potenciómetro (Corning 130) a 25°C, suspendiendo 2g de muestra de pozol a los distintos tiempos de fermentación en 5 ml de agua destilada.

## 6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

En este sistema las proteínas se solubilizan en el buffer de carga 4x (H<sub>2</sub>O bidestilada, Glicerol, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol y azul de bromofenol), el detergente SDS se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto en la parte inferior del sistema, previniendo también la formación de interacciones hidrófobas entre las proteínas. 2-Mercaptoetanol (2-ME) reduce los puentes disulfuro. La mezcla se hirvió a 95°C durante 5 minutos para permitir la completa desnaturalización de las proteínas.

Las muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida al 10% y la electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

## 6.7 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

20µg de la amilasa pura de *B. subtilis* y *B. licheniformis* y 100µg de proteína del sobrenadante de *L. amylovorus* se precipitaron con Etanol/acetona 1:1 y se disolvieron en buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50mM DTT y 0.5% anfolitos). Con las soluciones se hidrataron las tiras IPG de 7cm con una escala de pH de 3-10 (Bio-Rad) a 20°C y 50V por 12 horas. Las proteínas se enfocaron a 20°C aplicando un gradiente de voltaje. Las tiras con las proteínas focalizadas fueron equilibradas en el buffer de equilibrio I (6M urea, 2% SDS, 0.05M Tris-HCl [pH 8.8] y 2% DDT) por 10 minutos, seguido de una agitación en el buffer de equilibrio II (6M urea, 2% SDS, 0.05M Tris-HCl [pH 8.8] y

2.5% de iodoacetamida) por 10 minutos. Las tiras se colocaron horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) a temperatura ambiente. La electroforesis se corrió durante una hora a 5mA para permitir la entrada de las proteínas al gel concentrador, la electroforesis se continuó a 15mA hasta que el frente llegó al final del gel.

### **6.8 Efecto del buffer de extracción, precipitación y resuspensión en tampón de hidratación en la recuperación de la actividad de la $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus***

Para establecer el efecto del tratamiento previo a la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida sobre la actividad amilolítica, la amilasa de *L. amylovorus* concentrada 15 veces se trató de la siguiente forma:

- 1) A 2.478 unidades enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* se les añadieron 16 $\mu$ l del tampón de extracción ASB-14.
- 2) A 2.487 unidades enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* se le añadieron 8 $\mu$ l del tampón de extracción ASB-14 2x y 8 $\mu$ l del tampón de hidratación 2x.
- 3) A 2.478 unidades enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* se le añadieron 8 $\mu$ l de tampón de extracción ASB-14 2x, la mezcla se precipito con 3 volúmenes de etanol/acetona fría 1:1 toda la noche y se resuspendió en 8 $\mu$ l de tampón de hidratación 2x.

Cabe aclarar que se mantuvo un control positivo de la enzima al cual no se le dio ningún tratamiento.

Posteriormente las muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida al 10% y la electroforesis se corrió a 20mA hasta que el frente llegó al final del gel. Se siguieron dos protocolos de renaturalización, el primero descrito para zimogramas realizados a partir de geles SDS-PAGE y el segundo una metodología

previamente reportada para la renaturalización de xilanasas después de la electroforesis bidimensional [35] con modificaciones menores.

### 6.9 Tratamiento de renaturalización y zimograma

Para renaturalizar las enzimas se probaron dos métodos:

1) Los geles se lavaron con buffer citrato-fosfato 10mM pH 7 para las amilasas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* y pH 5 para la amilasa de *L. amylovorus*, se dejaron toda la noche a 4°C en el mismo buffer. Posteriormente se incubaron con 1% de almidón soluble de papa (Prolabo) en buffer citrato-fosfato 10mM a los pH indicados para finalmente ser teñidos con una solución de lugol.

2) Los geles se dejaron toda la noche a 4°C en buffer citrato-fosfato 10mM pH 5, se agitaron a temperatura ambiente en el mismo buffer con 2.5% de Tritón X-100 y fueron lavados con buffer citrato-fosfato 10mM pH 5. Se incubaron con 1% de almidón soluble de papa (Prolabo) en buffer citrato-fosfato 10mM a pH 5; finalmente se tiñeron con una solución de lugol.

Los métodos completos se describen en el apéndice I.

### 6.10 Determinación de actividad amilolítica inicial en el pozol

Se peso un gramo de una muestra de pozol fermentado por 24 y 360 horas, las muestras se maceraron con CO<sub>2</sub> hasta la obtención de partículas finas. Estas se colocaron en tubos cónicos de centrifuga de 15ml que contenían perlas de vidrio (Sigma) y 3ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 3.5, 4, 4.5 y 5. Las muestras se agitaron a máxima velocidad por 3 horas a 4°C, y posteriormente se agitaron a máxima velocidad 5 minutos a temperatura ambiente. A la fracción soluble se le determinó actividad por el método yodo-yoduro y DNS (Ver apéndice I).

### 6.11 Extracción de proteínas del pozol

El método desarrollado por Cárdenas (2011) para la extracción de proteínas de pozol es el siguiente:

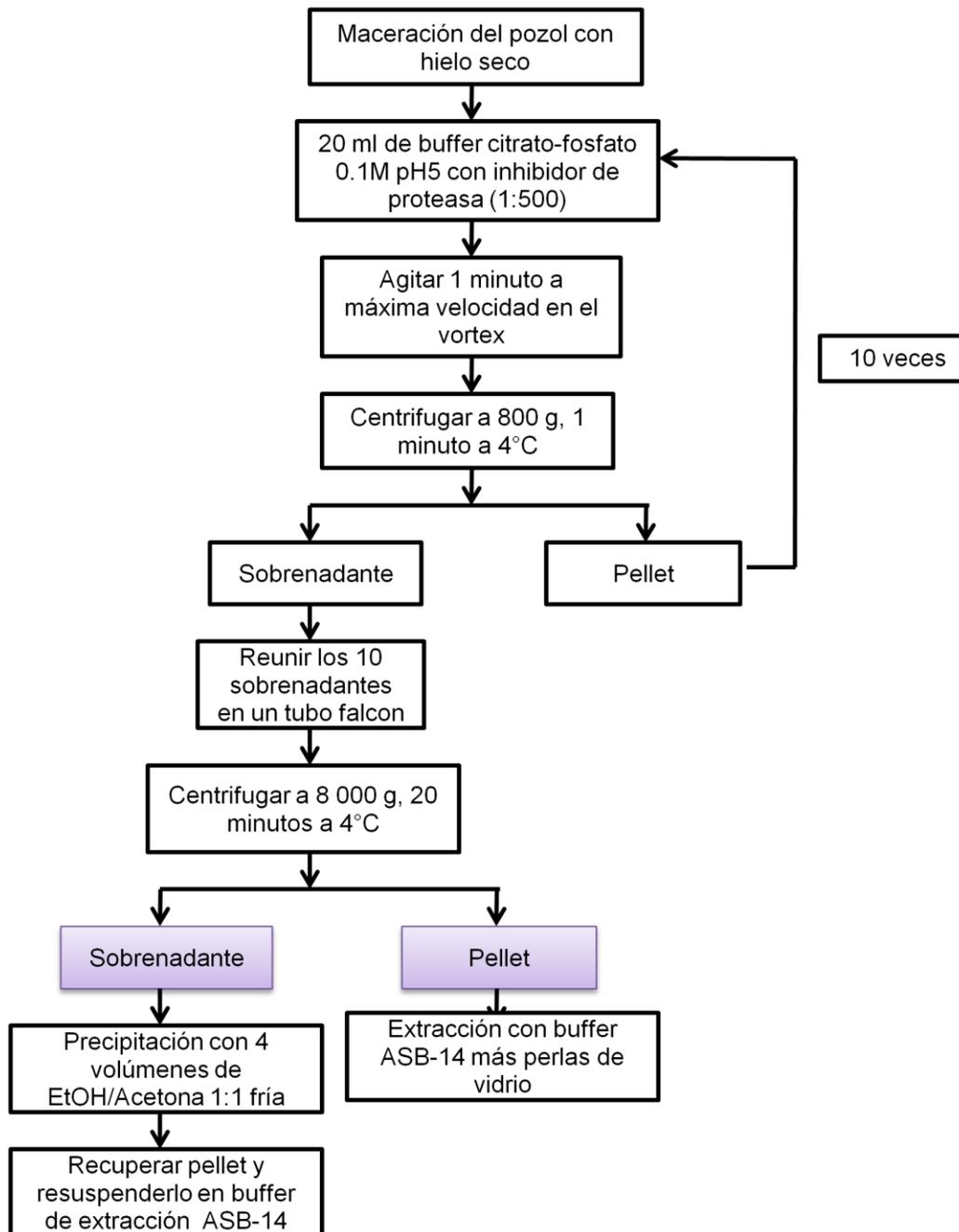


Figura 6. Diagrama de extracción de proteínas de pozol.

Para probar que es posible recuperar la actividad de los extractos obtenidos en la extracción a una masa de pozol fermentada por 15 días se le adicionaron 208.635 unidades enzimáticas de *L. amylovorus*. La mezcla se agitó durante 30 minutos para asegurar la interacción de la enzima con la masa, se siguió el protocolo antes descrito y a las dos fracciones obtenidas se les determinó cantidad de proteína y actividad por Randox (Ver apéndice I).

Para analizar las muestras 0.078 mg de proteína del pellet y 0.08mg de proteína del sobrenadante se precipitaron en con Etanol/acetona 1:1 toda la noche a -20°C, posteriormente se disolvieron en buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50mM DTT y 0.5% anfolitos). Las muestras fueron cargadas en el gel de poliacrilamida al 10% y la electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

Para los geles de poliacrilamida 2D-PAGE se utilizaron 0.14mg de proteína del pellet y 0.15mg de proteína del sobrenadante, ambas fracciones se precipitaron con Etanol/acetona 1:1 y se disolvieron en buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50mM DTT y 0.5% anfolitos). Con las soluciones se hidrataron las tiras IPG de 7 cm con una escala de pH de 3-10 (Bio-Rad) a 20°C y 50V por 12 horas. Las proteínas se enfocaron a 20°C aplicando un gradiente de voltaje. Las tiras con las proteínas focalizadas fueron equilibradas en buffer de equilibrio I (6 M urea, 2% SDS, 0.05M Tris-HCl [pH 8.8] y 2% DDT) por 10 minutos, seguido de una agitación en buffer de equilibrio II (6M urea, 2% SDS, 0.05M Tris-HCl [pH 8.8] y 2.5% de iodoacetamida) por 10 minutos. Las tiras se colocaron horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) a temperatura ambiente. La electroforesis se corrió durante una hora a 5mA para permitir la entrada de las proteínas al gel concentrador, la electroforesis se continuó a 15mA hasta que el frente llegó al final del gel.

La renaturalización de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos.

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Recuperación de la actividad *in situ* de las amilasas comerciales y la de *L. amylovorus*

Considerando que la electroforesis en una y dos dimensiones constituyen dos de las técnicas de más grande alcance para resolver mezclas de proteínas, en el laboratorio se decidió utilizarlas para estudiar las amilasas presentes en el pozol. Estas técnicas tienen como característica principal la desnaturalización de las proteínas para permitir la separación por masa y pI, eliminando la interferencia de la conformación. Estos tratamientos eliminan, usualmente, la actividad enzimática impidiendo la identificación *in situ* por lo que fue necesario encontrar un método adecuado para recuperarla.

Como una primera aproximación y para poder establecer si las enzimas podían ser renaturalizadas *in situ*, se utilizaron las amilasas comerciales provenientes de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, considerando que se adquieren puras y tienen una alta actividad específica. La actividad amilolítica para estas amilasas se determinó por el método de extinción del complejo yodo-almidón, obteniéndose 30.496 y 25.842 U/ml respectivamente. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con 0.483 unidades de la  $\alpha$ -amilasa proveniente de *B. subtilis* y 0.411 unidades de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*.

La renaturalización de la enzima en el gel se realizó con el primer método descrito en materiales y métodos. Como se observa en la figura 7, se logra recuperar la actividad de ambas enzimas, las bandas de actividad se encuentran cercanas a un peso molecular de 66 KDa. El peso reportado para la amilasa de *B. licheniformis* es de 62 KDa (Sigma-Aldrich), en el caso de la enzima de *B. subtilis* el proveedor no proporcionan el peso molecular, sin embargo, diversos reportes indican pesos

de 48, [32] y 78KDa [37]. Por lo que se consideró que las dos bandas de actividad se localizan adecuadamente.

Por otro lado se probó la re-naturalización con y sin tratamiento térmico de las mismas muestras (95°C por 5 minutos). En la figura 7 se observa la actividad dispersa en el gel por lo que no es fácilmente detectable cuando las muestras no llevan este tratamiento, por lo que se concluye que es un paso necesario para la identificación de la actividad en zimograma.

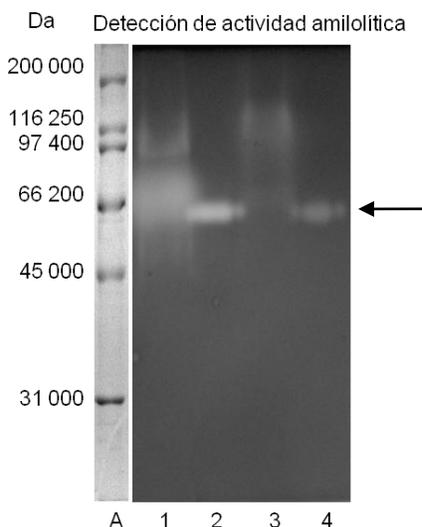
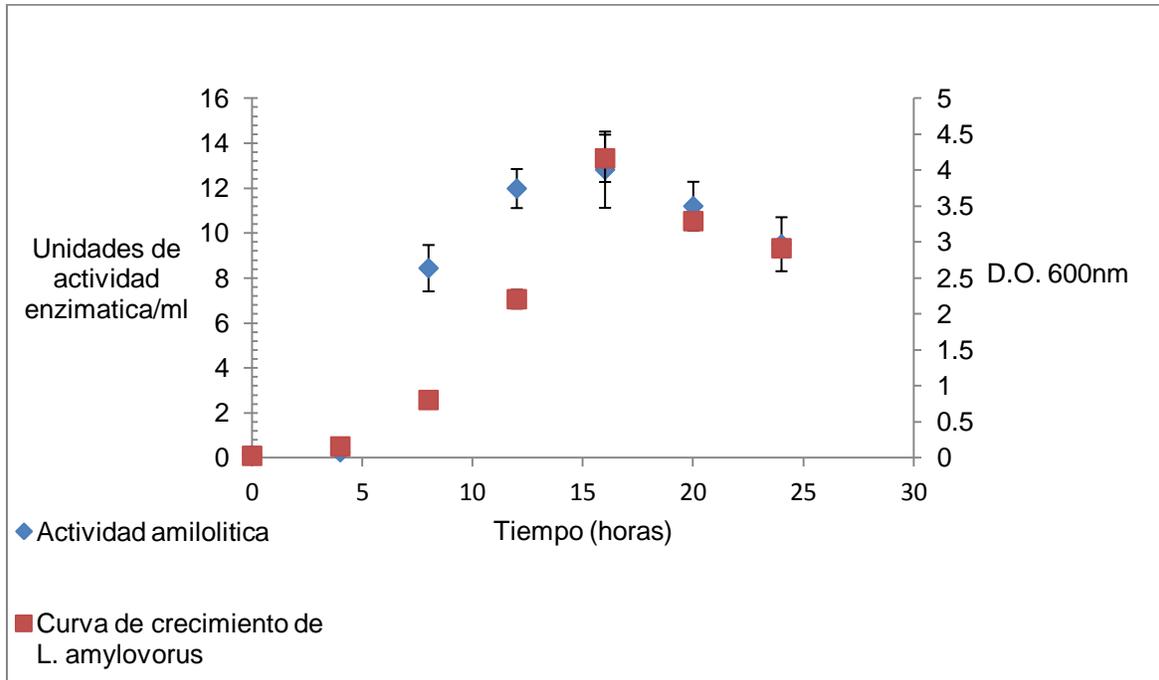


Figura 7. Zimograma realizado con un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). A) Marcador de peso molecular Broad-range Bio-Rad Carril 1) 0.48U de amilasa de *B. subtilis* sin tratamiento térmico, carril 2) 0.48U de amilasa de *B. subtilis* con tratamiento térmico, carril 3) 0.41U de amilasa de *B. licheniformis* sin tratamiento térmico y carril 4) 0.41U de amilasa de *B. licheniformis* con tratamiento térmico.

Con las condiciones estandarizadas en las amilasas comerciales para la recuperación de la actividad después de la electroforesis SDS-PAGE, el siguiente paso fue probarlas en una enzima no comercial para lo cual se selecciono la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* como una amilasa de una bacteria láctica presente en fermentaciones vegetales. Se determinó el tiempo al cual el microorganismo presenta la máxima actividad enzimática. En la gráfica 1 se observa que la

producción de la enzima en este microorganismo está ligada a su crecimiento, encontrándose a las 16 horas la actividad máxima, 12.82 U/ml.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento y actividad enzimática de *L. amylovorus* en medio MRS-almidón.

Para la producción de la enzima se partió de un cultivo nuevo de 50ml del cual se recuperó el sobrenadante y se concentró por sublimación para su análisis. La concentración inicial de proteína total fue de 130.5 $\mu$ g y la actividad amilolítica de 591.5U medida con el método de extinción del complejo yodo-almidón y 414.5U con el método de liberación de azúcares reductores DNS. Después de concentrar 17 veces se obtuvieron 18.36 $\mu$ g de proteína y una actividad de 360.24U con el método de extinción del complejo yodo-almidón (Tabla 5). Se puede observar que aunque disminuyó de manera importante la concentración de proteína durante la sublimación, la actividad se mantuvo.

Tabla 5. Diferentes concentraciones de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*.

Método de concentración	Volumen (ml)	Proteína total ( $\mu\text{g}$ )	Actividad total (U)	Actividad específica (U/ $\mu\text{g}$ )	Recuperación %
Ninguno	50	130.5	591.5	4.53	100
			414.5	3.18	
Vacío	25	78.75	567.25	7.2	95.90
	16.7	54.06	553.94	10.43	95.33
	12.5	51.37	535	10.41	90.45
	2.9	18.36	360.24	19.62	60.90

Los diferentes extractos obtenidos de la enzima de *L. amylovorus* fueron analizados en un gel desnaturizante (SDS-PAGE). Con el objetivo de identificar la mínima cantidad que puede ser detectada se realizó un zimograma con diferentes cantidades de la enzima. En la figura 8 se puede observar la actividad en todas las muestras aún en la menos concentrada, que contiene solo 0.176U, es posible observar la banda de actividad. La migración de la amilasa en el gel corresponde con el peso teórico de la amilasa (104.9 KDa) ya que las bandas de actividad se observan a 105 KDa.

Nuevamente se observa que para poder observar la actividad en un zimograma es necesario lograr la completa desnaturización de las proteínas con un tratamiento térmico previo, puesto que, al omitir este paso no son capaces de migrar adecuadamente a través del gel. Las temperaturas elevadas no afectan la recuperación de la actividad de la amilasa de *L. amylovorus* y ayudan al desplegamiento de la estructura nativa.

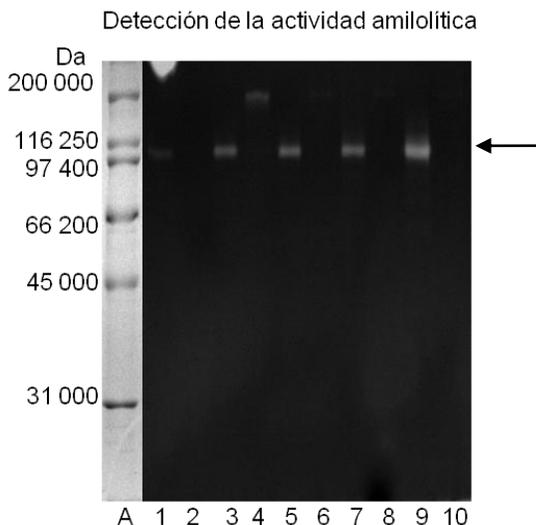


Figura 8. Zimograma de la amilasa de *L. amylovorus*. A) Marcador de peso molecular Broad-range Bio-Rad. Carril 1) 0.176U de enzima de *L. amylovorus* con tratamiento térmico. Carril 2) 0.176U de enzima de *L. amylovorus* sin tratamiento térmico. Carril 3) 0.363U de enzima de *L. amylovorus* con tratamiento térmico. Carril 4) 0.363U de enzima de *L. amylovorus* sin tratamiento térmico. Carril 5) 0.531U de enzima de *L. amylovorus* con tratamiento térmico. Carril 6) 0.531U de enzima de *L. amylovorus* sin tratamiento térmico. Carril 7) 0.9U de enzima de *L. amylovorus* con tratamiento térmico. Carril 8) 0.9U de enzima de *L. amylovorus* sin tratamiento térmico. Carril 9) 2.44U de enzima de *L. amylovorus* con tratamiento térmico y carril 10) 2.44U de enzima de *L. amylovorus* sin tratamiento térmico.

## 7.2 Efecto del tratamiento utilizado para realizar geles en 2D

Las amilasas comerciales de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y la enzima de *L. amylovorus* fueron analizadas en los geles bidimensionales (2D-PAGE). El estudio en geles bidimensionales requiere el uso de buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50mM de DTT y 0.5% Anfolitos), constituido por agentes caotrópicos y reductores que provocan la ruptura de los puentes de hidrógeno, de las interacciones hidrofílicas y puentes disulfuro que permite desplegar las proteínas. Es común que estos sean neutros, en rangos de concentraciones elevadas, que van desde 5 a 9M, para asegurar el rompimiento

de la estructura secundaria. Así como detergentes que rompen interacciones hidrofóbicas y previenen la formación de éstas entre proteínas hidrofóbicas lo que permite la extracción y solubilización de las proteínas [3, 5]. Por lo que fue necesario probar su efecto en la recuperación de la actividad en las amilasas comerciales de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y en la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*, por ello 0.514, 0.604 y 0.176 unidades de actividad enzimática de *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *L. amylovorus*, respectivamente, se precipitaron con 4 volúmenes de etanol/acetona 1:1 toda la noche, las enzimas se recuperaron y disolvieron en el buffer. La separación se realizó en dos etapas: la primera consistió en la focalización de las proteínas para finalizar con la separación por peso molecular.

Se encontró que las enzimas logran recuperar su actividad después de seis lavados sucesivos con buffer citrato-fosfato 10mM pH 7 en el caso de las amilasas comerciales y pH 5 para *L. amylovorus*. En la figura 9 se observa que las amilasas de *B. licheniformis* y *B. subtilis* dan una señal a lo largo del gel, lo cual no es de esperarse, puesto que en el primer paso las proteínas migran a través del gel por un gradiente de pH hasta alcanzar una posición estacionaria donde su carga neta es cero. De acuerdo a lo que se puede observar las muestras pueden no haber focalizado correctamente, pero además contener más de una amilasa o bien estar parcialmente degradadas. La enzima de *B. licheniformis* presenta un punto isoeléctrico de 5.1 mientras que para *B. subtilis* es de 6.6 (Figura 9). Existen reportes de los valores del punto isoeléctrico de las alfa amilasas de estos microorganismos, las cuales van de 5.2-5.4 en el caso de *B. licheniformis* y de 5.0-5.6 [32], 6.2 y 7 [37] para *B. subtilis*.

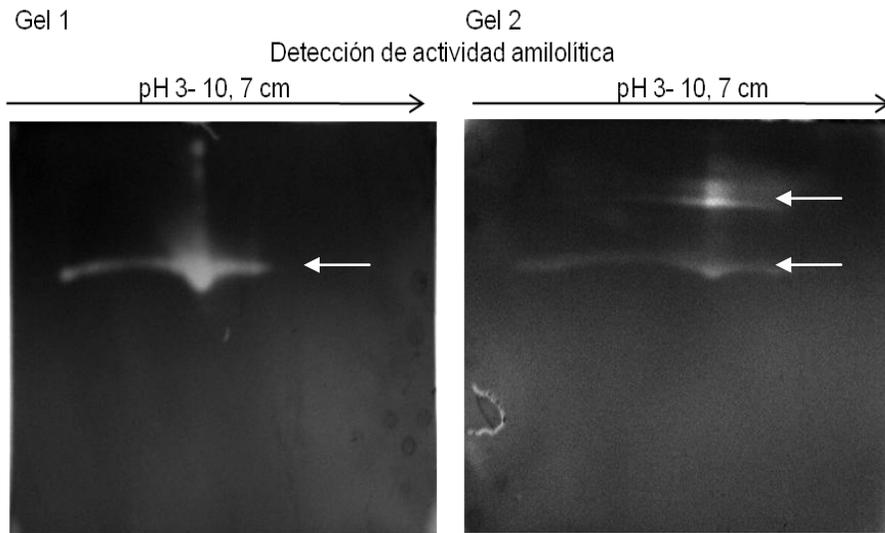


Figura 9. Zimograma de la Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Gel 1: Amilasa de *B. licheniformis*. Gel 2: Amilasa de *B. subtilis*.

En el caso de la amilasa de *L. amylovorus*, se observa que la enzima presenta un punto isoeléctrico de 4.7 el cual coinciden con el valor teórico de 4.73 (Figura 10).

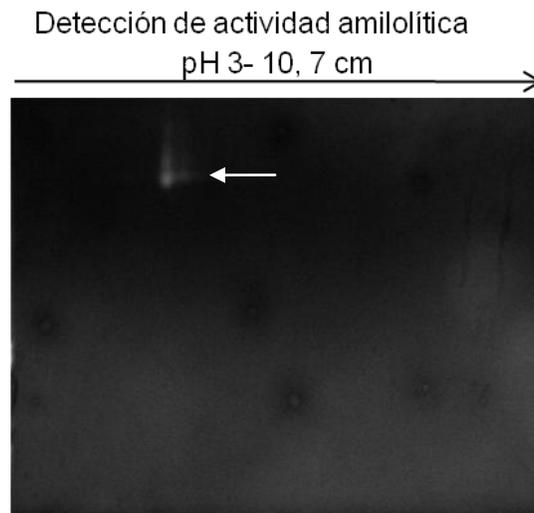


Figura 10. Zimograma en electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) de la amilasa de *L. amylovorus*.

### **7.3 Efecto del buffer de extracción, precipitación y resuspensión en buffer de hidratación en la recuperación de la actividad en la $\alpha$ -amilasas de *Lactobacillus amylovorus***

El método establecido para la extracción de proteínas del pozol incluye tanto pasos mecánicos como químicos, la maceración del pozol con CO<sub>2</sub> ayuda a disminuir el tamaño de partícula favoreciendo la interacción del buffer de extracción con los gránulos de almidón insoluble. Tomando en cuenta que la enzima de *L. amylovorus* es extracelular y para recuperarla del cultivo solo es necesario centrifugarlo, se decidió entonces resuspender 2.47 unidades de actividad enzimática en buffer de extracción. Adicionalmente se probó el efecto de la precipitación y resuspensión en buffer de hidratación en la recuperación de la actividad en los geles en 1 y 2D.

Las muestras previamente tratadas fueron corridas en los geles SDS-PAGE para posteriormente probar los dos métodos de renaturalización descritos. A pesar de que la estructura tridimensional de la enzima se ve afectada por el uso de detergentes, agentes caotrópicos y por la precipitación, fue posible lograr la renaturalización, observándose una mayor recuperación de actividad con la metodología propuesta para la renaturalización de xilanasas en 2-D. En todos los casos el peso molecular es de 105KDa que corresponde al valor teórico de la amilasa, de 104.9KDa. Por encima de éste peso se observan varias bandas de actividad debido probablemente a que al precipitar y resuspender se formaron algunos agregados (Figura 11). En la figura 12 se observa el gel en dos dimensiones renaturalizado con el protocolo que mostró mejor resultado en el SDS-PAGE (xilanasas). La actividad se observa en el peso y en el punto isoeléctrico esperado.

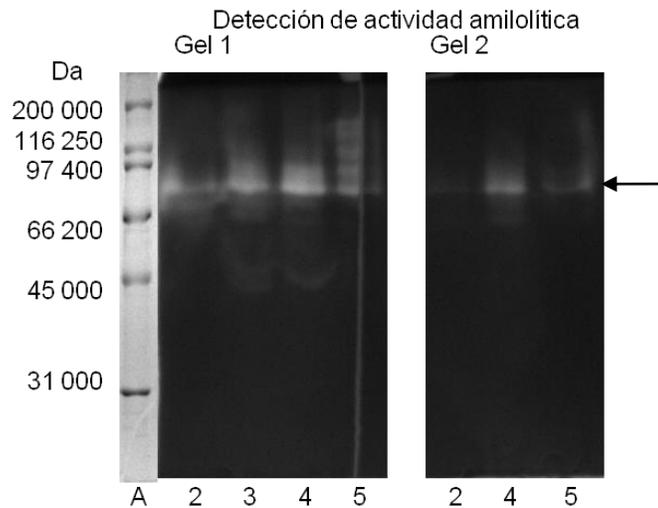


Figura 11. Zimograma de la amilasa de *L. amylovorus*. Gel 1: Renaturalización con el método de xilanasas. Gel 2: Renaturalización con el método de amilasas. A) Marcador de peso molecular Broad-range Bio-Rad. Carril 2) enzima de *L. amylovorus* redisuelta en tampón ASB-14. Carril 3) control positivo (enzima sin tratamiento). Carril 4) enzima de *L. amylovorus* redisuelta en tampón ASB-14 mas tampón de hidratación. Carril 5) enzima de *L. amylovorus* resuspendida en tampón ASB-14, precipitada y resuspendida en tampón de hidratación.



Figura 12. Zimograma de la amilasa de *L. amylovorus* resuspendida en tampón ASB-14, precipitada, resuspendida en tampón de hidratación y sometida a la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).

Se considero que la actividad observada en este gel, 0.176 unidades (Figura 12), es la mínima detectable en zimograma.

#### 7.4 Pozol

A una muestra de pozol adquirida en el mercado de Villahermosa, Tabasco se le determinó el pH, el cual se redujo de 5.11 a 4.52 en 24 horas y llegó hasta 3.88 a las 360 horas de fermentación (Tabla 6). Los valores obtenidos de pH son menores a los reportados de muestras de pozol de la misma región [23], lo que podría indicar que la fermentación en la masa de pozol ya había comenzado.

Tabla 6. <sup>a</sup> Valores promedio de pH de las muestras de pozol fermentadas a diferentes tiempos.

<sup>b</sup> Valores promedio de pH reportados por Díaz-Ruíz (2003).

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH
0	5.11 <sup>a</sup> /7.4 <sup>b</sup>
24	4.52 <sup>a</sup> /4.8 <sup>b</sup>
48	4.22 <sup>a</sup> /4.8 <sup>b</sup>
72	4.04 <sup>a</sup> /4.4 <sup>b</sup>
360	3.88 <sup>a</sup>

#### 7.4.1 Determinación de la actividad inicial del pozol

Para determinar la actividad en dos muestras de pozol se decidió utilizar las técnicas yodo-yoduro y DNS. Las pruebas se realizaron a dos temperaturas diferentes 36°C y 50°C en un intervalo de pH de 3.5-5.

En el caso de la muestra fermentada 24 horas no fue posible detectar la actividad amilolítica por ninguno de los dos métodos a las temperaturas e intervalo de pH establecidos. En el caso del fermentado 360 horas si se pudo detectar la actividad y se observa mayor a pH 5 que a pH 3.5. La temperatura de incubación también tuvo efecto sobre la medición. Los resultados se resumen en las tablas 7 y 8. Ningún estudio previo había reportado la actividad amilolítica del pozol, solo en bacterias aisladas y purificadas, e incluso en ellas no siempre es posible detectar actividad amilolítica en los sobrenadantes de los cultivos con las técnicas mencionadas.

Tabla 7. Actividad amilolítica de las muestras de pozol fermentadas por 24 y 360 horas por el método yodo-yoduro. El signo (-) indica que no hubo actividad.

Tiempo de fermentación (horas)	pH	Temperatura de reacción	
		36°C	50°C
		Unidades de enzima (U/ml)	Unidades de enzima (U/ml)
24	3.5		
	4		
	4.5	-	-
	5		
360	3.5	1.67	0.86
	4	2.1	0.86
	4.5	2.4	1.59
	5	2.75	1.52

Tabla 8. Actividad amilolítica de las muestras de pozol fermentadas por 24 y 360 horas por el método DNS. El signo (-) indica que no hubo actividad.

Tiempo de fermentación (horas)	pH	Temperatura de reacción	
		36°C	50°C
		Unidades de enzima (U/ml)	Unidades de enzima (U/ml)
24	3.5		
	4		
	4.5	-	-
	5		
360	3.5	0.5	0.34
	4	0.54	0.45
	4.5	0.58	0.49
	5	0.71	0.49

#### 7.4.2 Extracción de las proteínas del pozol

A pesar de las limitaciones en la electroforesis bidimensional con respecto a la reproducibilidad, resolución y la dificultad de la separación eficiente de las proteínas de baja abundancia, esta técnica sigue siendo uno de los más importantes métodos para estudiar muestras complejas. Diferentes protocolos se han desarrollado para contrarrestar estas limitaciones, sin embargo la extracción de las proteínas sigue siendo un paso restrictivo en el estudio proteómico puesto que es necesario lograr la solubilización de todas las proteínas presentes en la muestra [1]. El protocolo propuesto por Cárdenas (2011) nos permite extraer de forma reproducible las proteínas del pozo.

Para poder validar la metodología esta metodología, fue necesario corroborar que la actividad se puede recuperar en el gel 2D y dado que no se conoce el número

de amilasas presente en el pozol se decidió utilizar como control interno la enzima de *L. amylovorus*. Para ello se incubó la amilasa de este microorganismo, como se describió en materiales y métodos.

Se buscó un método más sensible para la determinación de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y se decidió utilizar el sistema Randox que utiliza etilideno p-nitrofenil-maltoheptaósido bloqueado como sustrato, la limitante es que la temperatura de reacción ya está establecida (37°C). Se encontraron 141.3U/l en el pellet y 260.7U/l en el sobrenadante.

De ambos extractos se realizó la electroforesis en una y dos dimensiones. En el caso de la primera dimensión la recuperación de la actividad se logró, tanto en el sobrenadante como en el pellet con ambos protocolos de renaturalización (Figura 13). Se observa mayor recuperación de la actividad cuando se utiliza el protocolo de renaturalización 2, por lo que para la electroforesis bidimensional solo se probó dicha metodología, siendo indetectable en la imagen en el caso de la fracción denominada pellet y apenas detectable en el sobrenadante (Figura 14), ya que ambos extractos se encuentran en el límite de detección de actividad en zimograma (0.0014U cuando la actividad es medida con el método de Randox).

No se observó otra señal adicional a la correspondiente al control interno, presumiblemente por que la actividad presente en el pozol corresponde a la suma de varias enzimas que aisladas, presenten una actividad por debajo del límite inferior al detectado en un zimograma.

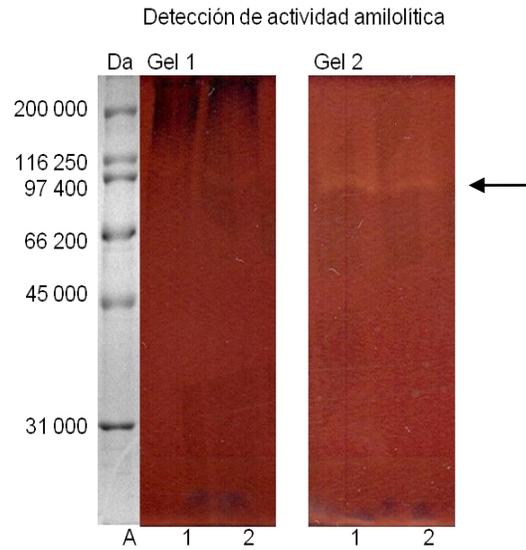


Figura 13. Zimograma de la amilasa de *L. amylovorus*. A) Marcador de peso molecular Broad-range Bio-Rad. Gel 1: Metodología propuesta para amilasas. Gel 2: Metodología propuesta para xilanasas. Carril 1) Fracción denominada pellet, carril 2) Fracción denominada sobrenadante.

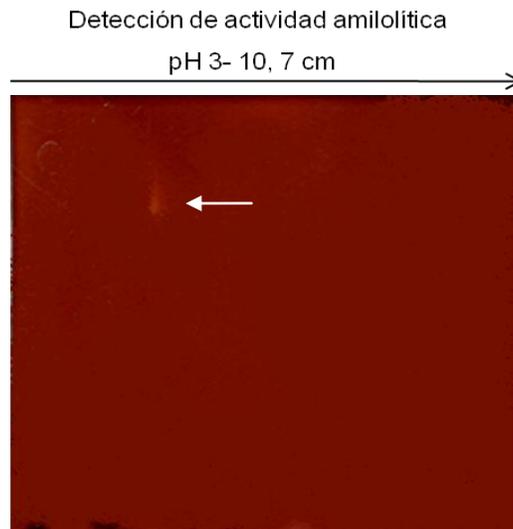


Figura 14. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Zimograma de la fracción denominada sobrenadante.

## VIII. CONCLUSIONES

- \* El tiempo al cual *L. amylovorus* presenta la máxima actividad es a las 16 horas y se observó que la producción de la enzima en este microorganismo está asociada a su crecimiento.
- \* Se validó la metodología que permitió la renaturalización de proteínas en geles SDS-PAGE.
- \* Se estableció la metodología que permitió la recuperación de la actividad amilolítica de las enzimas control después de un tratamiento con el buffer de hidratación utilizado para la 2ª dimensión (Urea, tiourea, CHAPS, ASB 14, DTT y anfolitos).
- \* El buffer de extracción, la precipitación y resuspensión en buffer de hidratación que son requeridos en el estudio proteómico, no afectan la recuperación de la actividad en la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*.
- \* Se obtuvo un protocolo de extracción reproducible que nos permitió obtener el metaproteoma del pozol y se validó la metodología de renaturalización usando como control interno la  $\alpha$ -amilasas de *L. amylovorus*.
- \* La actividad mínima detectable en un zimograma es de 0.17U con el método de extinción del complejo yodo-almidón, 0.13U con el método de liberación de azúcares reductores y 0.0014U con el sistema Randox.
- \* No se logró visualizar en un zimograma la actividad en el pozol posiblemente porque al separar las enzimas, cada una de ellas presenta una menor actividad que la mínima necesaria para ser detectada.

## IX. PERSPECTIVAS

- \* La cantidad de proteína hasta ahora extraída no nos ha permitido la identificación de las enzimas de interés, por lo cual partiendo de una mayor muestra o haciendo uso de una columna de afinidad lograremos obtener una mayor concentración de  $\alpha$ -amilasas.
  
- \* Buscar un método más sensible que permita identificar las  $\alpha$ -amilasas *in situ*.
  
- \* Realizar la extracción de las proteínas del pozol a diferentes tiempos de fermentación, secuenciar los extractos obtenidos e identificar las  $\alpha$ -amilasas que participan en la fermentación.
  
- \* Identificar otras proteínas participantes en el proceso de fermentación y establecer correlación con las  $\alpha$ -amilasas.

## X. APÉNDICE I

### I. Medio de cultivo

- MRS-almidón

El medio M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y almidón constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El magnesio, manganeso y acetato aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

El medio de cultivo se esteriliza a 121°C por 15 minutos, antes de ser utilizado se mantiene a 30°C por 24 horas para corroborar su esterilidad.

Tabla 9. Componentes del medio MRS-almidón

Componentes	Cantidad g/L
Peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Almidón	20
Citrato de amonio	2.17
Acetato de sodio trihidratado	5
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.207
Sulfato de manganeso hidratado	0.056
Fosfato de potasio dibásico	2.62

## II. Cuantificación de proteína por Bradford.

- Del sobrenadante de *L. amylovorus* recuperado a las 16 horas y a diferentes concentraciones.

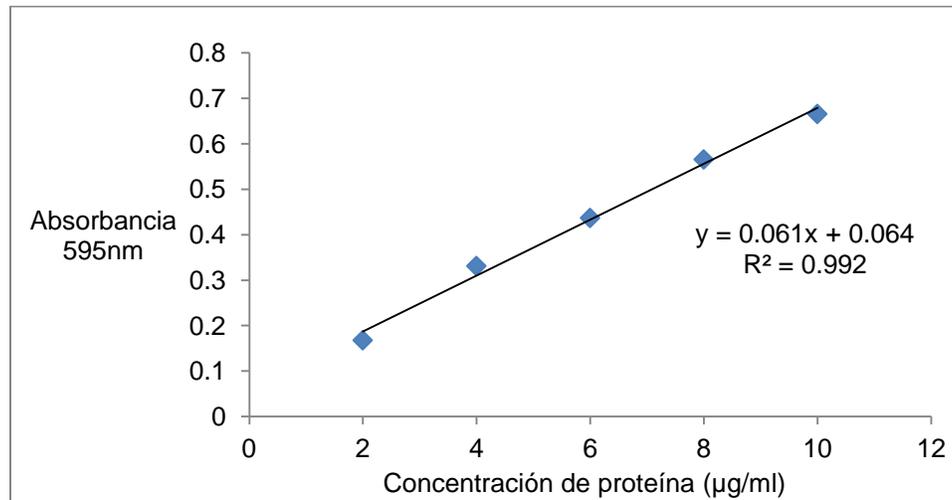
Los sobrenadantes concentrados se diluyeron 1:100, tanto de la muestra sin concentrar como de las diluciones se tomaron 800µl y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5ml. Asimismo se tomaron 800µl de agua destilada estéril como blanco. A cada uno de los tubos, incluyendo el blanco, se le adicionaron 200µl de reactivo Bradford, se agitaron en el vortex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia de las muestras a 595nm.

Para determinar la cantidad de proteína en las muestras se realizó una curva patrón. El rango lineal del ensayo es de 1.2 a 10µg/ml al usar BSA como estándar, tomando en cuenta esto se partió de una solución stock de 1mg/ml y en tubos eppendorf de 1.5ml se preparó la curva estándar de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 10. Curva patrón de BSA para determinar la cantidad de proteína por Bradford.

Concentración de proteína (µg/ml)	BSA (µl)	Agua desionizada (µl)
2	2	798
4	4	796
6	6	794
8	8	792
10	10	790

A cada tubo se le agregaron 200µl de reactivo Bradford, se agitaron en el vortex y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 595nm usando cubetas Uvette (Eppendorf). Con los valores obtenidos se graficó la absorbancia contra la concentración de proteína de referencia (Gráfica 1) para obtener una recta ( $y=mx + b$ ), en donde  $y=$  Absorbancia,  $x=$  Concentración de proteína (µg/mL).



Gráfica 2. Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Bradford.

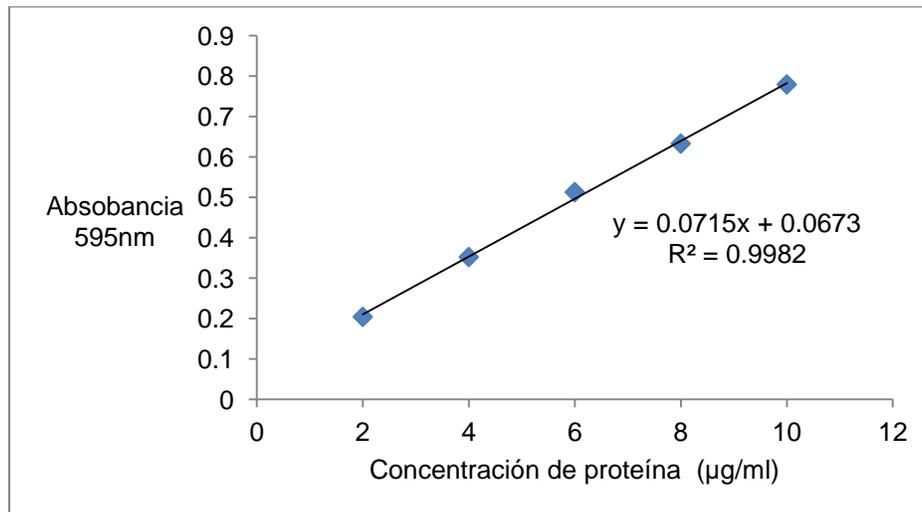
- De las fracciones obtenidas de la extracción de proteínas del pozol usando como control interno *L. amylovorus*.

Se diluyeron las fracciones denominadas sobrenadante y pellet 1:1000, de estas se tomaron 800µl y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5ml. Asimismo se tomaron 800µl de buffer de extracción ASB-14 diluido 1:100 como blanco. A cada uno de los tubos, incluyendo el blanco, se le adicionaron 200µl de reactivo Bradford, se agitaron en el vortex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia de las muestras a 595nm. Para determinar la cantidad de proteína en las muestras se realizó una curva patrón con buffer de extracción ASB-14 diluido 1:100. La curva se preparó de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 11. Curva patrón de BSA para determinar la cantidad de proteína por Bradford.

Concentración de proteína (µg/ml)	BSA (µl)	Agua desionizada (µl)	Buffer de extracción ASB-14 (µl)
2	2	718	
4	4	716	
6	6	714	
8	8	712	80
10	10	710	

A cada tubo se le agregaron 200µl de reactivo Bradford, se agitaron en el vortex y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 595nm usando cubetas Uvette (Eppendorf). Con los valores obtenido se graficó la absorbancia contra la concentración de proteína de referencia (Gráfica 3) para obtener una recta ( $y=mx + b$ ), en donde  $y=$  Absorbancia,  $x=$  Concentración de proteína (µg/ml).



Gráfica3. Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Bradford.

### III. Actividad amilolítica por yodo-yoduro

Este método fue usado para determinar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* y de las amilasas comerciales de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. Este ensayo se llevo a cabo como se describe a continuación:

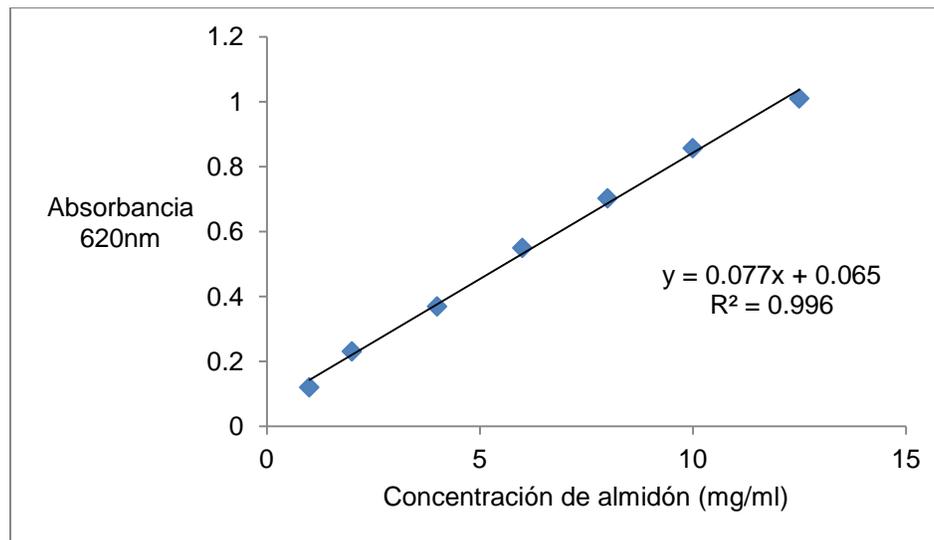
#### a. Curva de almidón

Se partió de una concentración de 12.5mg/ml de almidón soluble (Prolabo) en 10ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 para *Lactobacillus amylovorus*, pH 7 para las amilasas comerciales de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*.

Tabla 12. Curva patrón de almidón para determinar la actividad amilolítica por yodo-yoduro.

Tubo	Concentración de almidón (mg/ml)	Stock de almidón ( $\mu$ l)	Buffer citrato-fosfato 10mM ( $\mu$ l)
1	0	0	100
2	1	8	92
3	2	16	84
4	4	32	68
5	6	48	52
6	8	64	32
7	10	80	20
8	12.5	100	0

A cada tubo se le agregó 2.4ml de la solución yodo-yoduro al 4%, se agitó en el vortex y se leyó la absorbancia a 620nm. La absorbancia se graficó contra la concentración de almidón (Gráfica 4) para obtener la recta ( $y = mx + b$ ), donde  $y$ =Absorbancia,  $x$ = concentración de almidón (mg/ml) de la muestra.



Gráfica 4. Curva patrón de almidón soluble para la determinación de actividad por el método yodo-yoduro.

#### b. Reacción enzimática

Seis tubos de ensayo fueron marcados, tres como blanco y los otros tres como muestra: en el blanco se agregaron 80 $\mu$ l de la solución de almidón (12.5mg/ml) en buffer citrato-fosfato 10mM a pH 5 para el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* y pH 7 para las amilasas de *B. licheniformis* y *B. subtilis*, 10 $\mu$ l de ácido sulfúrico 2N con la finalidad de detener la reacción enzimática y 10 $\mu$ l de la muestra, se agitaron en el vortex y se pusieron en hielo inmediatamente. En los tubos marcados como muestra se pusieron 80 $\mu$ l de la solución de almidón (12.5mg/ml) en buffer citrato-fosfato 10mM a pH 5 para la muestra de *L. amylovorus* y pH 7 para las amilasas de *B. licheniformis* y *B. subtilis* y 10 $\mu$ l de la muestra con la enzima. La reacción se incubó a 63°C en el caso de *Lactobacillus amylovorus* y *B. subtilis* mientras que para *B. licheniformis* la reacción fue incubada a 90°C por 10 minutos, al término de este tiempo se adicionaron 10 $\mu$ l de ácido sulfúrico 2N, se agitaron en el vortex

colocándolos inmediatamente en hielo. A todos los tubos se les agregó 2.4ml de solución yodo-yoduro al 4%, para su posterior lectura en el espectrofotómetro a 620nm.

$$U \text{ enzima/ml} = (D.O \text{ del blanco} - D.O \text{ de la muestra}) - * 3$$

Donde:

P: es la pendiente de la curva estándar de almidón

Una unidad de enzima está definida como la cantidad de enzima que permite la hidrólisis de 10mg de almidón en 30 minutos [40].

#### **IV. Actividad amilolítica por cuantificación de azúcares reductores con DNS**

Este ensayo se lleva a cabo como se describe a continuación:

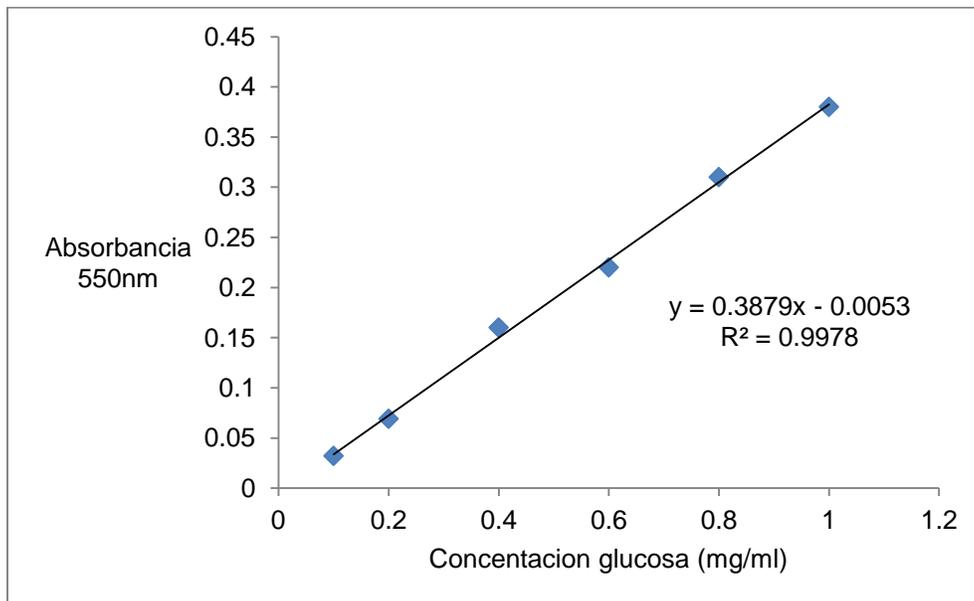
##### **a. Curva de glucosa**

Se partió de una concentración de 1mg/ml de glucosa (J.T. Baker) en 10ml de agua, en tubos de ensayo se preparó la curva estándar de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 13. Curva patrón de glucosa para determinar la actividad amilolítica por el método DNS.

<b>Tubo</b>	<b>Concentración de glucosa mg/ml</b>	<b>stock de glucosa (ml)</b>	<b>Agua (ml)</b>
1	0	0	1
2	0.1	0.1	0.9
3	0.2	0.2	0.8
4	0.4	0.4	0.6
5	0.6	0.6	0.4
6	0.8	0.8	0.2
7	1	1	0

A cada tubo se le agregó 1ml de DNS, se agitaron en el vortex, se hirvieron por 10 minutos en un baño de agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Se llevaron a un volumen final de 10ml, para ser leídos a 550nm. La absorbancia se graficó contra concentración de glucosa (Gráfica 5) para obtener la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ), donde  $y$ =Absorbancia,  $x$ = concentración de glucosa (mg/ml) de la muestra.



Gráfica 5. Curva patrón de glucosa para la determinación de actividad por el método de azúcares reductores con DNS.

#### b. Muestras

1. Se preparó una solución madre de 12.5mg/ml de almidón soluble (Prolabo) en buffer citrato-fosfato 10mM en un intervalo de pH 3.5-5.
2. Seis tubos eppendorf fueron marcados, tres como blanco y tres como muestra: en el blanco se agregó 800µl de solución de almidón, 100µl de la muestra, 100µl de NaOH 5N con la finalidad de detener la reacción, se agitaron los tubos en el vortex y se pusieron inmediatamente en hielo. De cada tubo se tomó una alícuota de 500µl, los cuales fueron colocados en un nuevo tubo de ensayo, se le agregaron 500µl de agua y 1ml de DNS. Los tubos fueron hervidos en un baño de agua durante 10 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente, para posteriormente ser llevados a un volumen final de 10ml con agua, los tubos fueron agitados en el vortex y se leyó la absorbancia a 550nm.

A los tubos marcados como muestra se le agregaron 800µl de solución madre de almidón, 100µl de la muestra, la reacción se incubó a 36°C y a 50°C por 10, transcurrido este tiempo se le adicionaron a cada tubo 100µl de NaOH 5N con

la finalidad de detener la reacción, se agitaron los tubos en el vortex y se pusieron inmediatamente en hielo. De cada tubo se tomo una alícuota de 500µl, los cuales fueron colocados en un nuevo tubo de ensayo, se le agregaron 500µl de agua y 1ml de DNS. Los tubos fueron hervidos en un baño de agua durante 10 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente, para posteriormente ser llevados a un volumen de 10ml con agua, los tubos se agitaron en el vortex y se leyó la absorbancia a 550nm.

La actividad amilolítica se determinó tomando en cuenta que una unidad de actividad amilolítica se define como la cantidad de enzima que libera 1µmol de azúcares reductores por minuto [39].

## **V. Actividad amilolítica por Randox**

### *a.* Estabilidad y preparación del reactivo

Se reconstruyó el contenido de un vial de Sustrato R1b con el volumen apropiado de buffer R1a, la solución es estable por 21 días de 2-8°C.

5ml para el kit 20 x 5ml (AY 1580)

20ml para el kit 9 x 20ml (AY 1582)

### *b.* Procedimiento

1. Se pipeteó dentro de un tubo eppendorf 1 ml del reactivo reconstituido el cual se mantuvo a 37°C.
2. Una vez que se llegó a la temperatura se agregó 0.02 ml de la muestra, se agitó rápidamente en el vortex y el contenido se vació en una celda de cuarzo para ser leído a 405nm después de 60 segundos.
3. Trascurrido el tiempo se inició el temporizador simultáneamente y se leyó la absorbancia nuevamente después de 1, 2 y 3 minutos manteniendo siempre la temperatura a 37°C.

## c. Cálculos

Para calcular la actividad de la amilasa se uso la siguiente fórmula:

$$U/I = 4712 \times \Delta A 405 \text{ nm/min}$$

Tabla 14. Componentes de los reactivos R1a y R1b usados para determinar la actividad amilolítica por Randox.

Contenido	Concentración inicial de los reactivos
R1a. Tampón	
Pipes buffer	50 mmol/L, pH 7.0
Cloruro de calcio	5.0 mmol/L
Cloruro de sodio	50 mmol/L
R1b. Sustrato	
Pipes buffer	12.5 mmol/l, pH 7.0
etilideno-G <sub>7</sub> pNp	1.0 mmol/L
α-glucosidasa	≥ 12 U/ml

## VI. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. Este fenómeno ocurre cuando una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. En geles de poliacrilamida las proteínas migran en respuesta de un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel. Esta migración depende de la intensidad de dicho campo, la carga neta, tamaño del poro del gel el cual disminuye con altas concentraciones de acrilamida, tamaño y forma de las proteínas, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizantes (SDS-PAGE), en este

sistema las proteínas se solubilizan por ebullición en presencia del detergente (SDS), éste se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema. 2-Mercaptoetanol (2-ME) o ditioneitol (DTT) se agregan durante la solubilización para reducir los puentes disulfuro.

- Procedimiento

- a. Preparación del gel

1. Se ensamblaron las placas de vidrio de 0.75mm en un soporte para formar el gel y se comprobó que no hubiera fugas.
2. Se preparó el gel separador y el gel concentrador al mismo tiempo al porcentaje deseado de acrilamida. Primero se depositó el gel separador dentro de las placas aproximadamente abarcando 5cm de altura.
3. Para evitar que no hubiera uniformidad en la superficie del gel se colocó isopropanol.
4. Después de la polimerización, se removió el isopropanol de las placas y se colocaron los peines que dieron lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vació en las placas el gel concentrador, evitando que se formaran burbujas entre un gel y otro.
6. Los geles se pre-corrieron una vez polimerizados 15 minutos a 20mA, después del tiempo transcurrido se colocaron las muestras.

- b. Preparación de las muestras

Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf, éstas se disolvieron en buffer de carga a una concentración final de 4x, las muestras con tratamiento térmico se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13200rpm durante 5 minutos y se colocaron en hielo mientras fueron cargadas en el gel, mientras que las muestras sin tratamiento térmico fueron cargadas en el gel directamente.

c. Condiciones de migración

Cada gel se corrió a 20mA hasta observar que las muestras llegaron al final de este, en la cámara de electroforesis Bio-Rad con un buffer de migración al 1x.

Tabla 15. Componentes del buffer de carga 4x

Componentes	Cantidad ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	8.5
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	2.5
Glicerol	2
SDS 10%	4
2-β mercaptoetanol	1
Azul de bromofenol	0.5

Tabla 16. Componentes del buffer de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Componentes	Cantidad g/L
Tris base	15
Glicina	72
SDS	5

Tabla 17. Pasos y soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

Solución stock I	0.2% Azul de Coomassie		
	90% Etanol		
Solución stock II	20% Ácido acético		
1. Fijación	Etanol	40%	30 min
	Ácido acético glacial	10%	
2. Tinción	Stock I	50%	20 min
	Stock II	50%	
3. Desteñir I	Solución de fijación		30 seg.
4. Desteñir II	Etanol	20%	Inspección visual
	Ácido acético glacial	10%	

## VII. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

La electroforesis bidimensional combina dos diferentes técnicas de separación electroforética en direcciones perpendiculares para una separación mayor de mezclas de proteínas complejas que cualquiera de los procedimientos individuales. La técnica más común utiliza como primer paso el isoelectroenfoque (IEF) en una tira de gel, seguido de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Después de la tinción, las proteínas aparecen en el gel final de dos dimensiones como manchas redondas o elípticas en lugar de las bandas rectangulares que se observan en geles de una dimensión.

El procedimiento de isoelectroenfoque más común se basa en el uso de anfólitos solubles, que son moléculas orgánicas relativamente pequeña con varios puntos isoeléctricos. El gradiente de pH de los geles de IEF se produce cuando los anfólitos solubles migran en el gel de la matriz hasta que alcanzan su punto isoeléctrico.

- Procedimiento

- a. Tratamiento previo de la muestra

1. Las muestras se precipitó con 3 volúmenes de etanol/acetona 1:1 fría y se dejó toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Se decantó el etanol/acetona y el resto se evaporó por vacío.
3. El precipitado se resuspendió en buffer de rehidratación, se agregaron los anfolitos a una concentración final de 0.5%, tomando en cuenta que el volumen final de esta mezcla fue de  $130\mu\text{l}$ .

- b. Hidratación de las tiras y focalización

1. De cada muestra se tomaron  $125\mu\text{l}$  y se colocaron en los carriles correspondientes, con la ayuda de las pinzas se removió cuidadosamente la cubierta protectora de las tiras IPG de 7cm con una escala de pH de 3-10 (Bio-Rad), las cuales se colocaron encima de las soluciones con la poliacrilamida hacia abajo.
2. Encima de cada tira se colocó aceite mineral hasta cubrirlas.
3. La hidratación se hizo a  $20^{\circ}\text{C}$  por 15 horas a 50V.
4. Las tiras con las muestras fueron enfocadas a  $20^{\circ}\text{C}$  aplicando un voltaje de 250V durante 15 minutos, lo que permitió remover la mayor cantidad de contaminantes y sales. Posteriormente se incrementó a 4 000V durante dos horas, una vez alcanzado este voltaje se dejaron las tiras a 500V hasta que se detuvo la corrida (paso de sostenimiento).

- c. Equilibrio

1. Las tiras con las proteínas focalizadas se enjugaron en 15ml de agua bidestilada durante 10 segundos, para quitar el exceso de aceite mineral.
2. Se colocaron en 2.5ml de buffer de equilibrio I contenido en un tubo cónico para centrifuga de 15ml, con agitación constante durante 10 minutos. Al transcurrir el tiempo se quitó el exceso de buffer con la ayuda de una sanita.
3. Posteriormente se pusieron en un tubo cónico para centrifuga que contenía 2.5ml de buffer de equilibrio II, y se agitaron durante 10 minutos.

d. Segunda dimensión

1. Se preparo el gel de poliacrilamida como se describió previamente (Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes).
2. A cada gel se le agregó agarosa de bajo punto de fusión lo que permitió que las tiras se deslizaran fácilmente.

e. Condiciones de migración

El gel se corrió a temperatura ambiente a 5mA por gel durante una hora y a 15mA por gel el resto de la corrida en la cámara de electroforesis Bio-Rad con un buffer de migración al 1x.

Tabla 18. Componentes del buffer de rehidratación

7 M urea
2 M tiourea
2% CHAPS
2% ASB-14
50mM de DTT
0.5% Anfolitos

Tabla 19. Componentes de buffer de equilibrio I y II.

Buffer de equilibrio I	Buffer de equilibrio II
6 M urea	6 M urea
2% SDS	2% SDS
0.05M Tris-HCl pH 8.8	0.05M Tris-HCl pH 8.8
20% Glicerol	20% Glicerol
2% DDT	2.5% iodoacetamida

Tabla 20. Componentes del buffer de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Componentes	Cantidad g/l
Tris base	15
Glicina	72
SDS	5

### VIII. Zimograma realizado a partir de geles SDS-PAGE

Nos permite visualizar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa por la aparición de bandas claras contra un fondo oscuro cuando se adiciona una solución de yodo-yoduro [40]. El yodo se introduce en el interior de la hélice de amilosa; cuando la  $\alpha$ -amilasa degrada el almidón la hélice se rompe y por lo tanto el yodo ya no es capaz de alojarse en el interior.

1. El gel se lavó tres veces después de haber realizado la electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE y seis veces después de la electroforesis bidimensional en condiciones desnaturizantes (2D-PAGE) con buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 para *L. amylovorus* y pH 7 para las amilasas comerciales, cada lavado se realizó por 15 minutos con agitación, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de SDS.
2. Se eliminó el buffer de lavado y el gel se dejó toda la noche a 4°C en buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 para *L. amylovorus* y pH 7 para las amilasas de *B. subtilis* y *B. licheniformis*.
3. El gel se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en 30ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 para *L. amylovorus* y pH 7 para las amilasas comerciales con almidón al 1%.
4. Por último el gel se tiñó con una solución de lugol, las muestra con actividad amilolítica se observaron por la aparición de un punto claro contra un fondo oscuro.

## **IX. Condiciones de renaturalización para xilanasas después de electroforesis bidimensional en condiciones desnaturalizantes (2D-PAGE).**

1. Al gel se le adicionó 30ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 y se dejó toda la noche a 4°C.
2. En el mismo buffer se lavó el gel con 2.5% de Tritón x-100 durante 5 minutos.
3. Se hicieron 5 lavados rápidos de aproximadamente 10 segundos y 3 lavados de 15 minutos con buffer citrato-fosfato 10mM pH 5.
4. El gel se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en 30ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 para con almidón al 1%.
5. Por último el gel se tiñó con una solución de lugol, las muestra con actividad amilolítica se observaron como bandas claras sobre un fondo oscuro.

## **X. Extracción de proteína de las muestras de pozol**

La extracción de proteína se hizo con la muestra de pozol fermentada por 15 días, de la siguiente forma:

1. La muestra se encuentra almacenada en un frasco de plástico con tapa a -70°C, el cual se colocó en hielo seco para evitar que se hidrate. Se agitó el frasco para poder obtener una muestra homogénea y se colocó un poco de esta en un mortero con hielo seco. Posteriormente se maceró hasta la obtención de partículas finas, de las cuales se pesaron 10 gramos.
2. La muestra se colocó en un tubo falcon de 50ml el cual contenía perlas de vidrio (Sigma), se adicionó 20ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5 más inhibidor de proteasa (1:500) y se agitó 1 minuto en el vortex a máxima velocidad.
3. Se centrifugó a 800 g a 4°C durante 1 minuto y el sobrenadante obtenido se reunió en tubos falcon de 50ml.

4. Al pellet obtenido se le adicionó 20ml de buffer citrato-fosfato 10mM pH 5, se agitó en el vortex a máxima velocidad durante 1 minutos y se centrifugó a 800g a 4°C durante 1 minuto, se repitió esta operación 10 veces más.
5. Las fracciones colectadas se centrifugaron a 8000g a 4°C por 20 minutos obteniéndose el pellet y el sobrenadante. El sobrenadante se precipitó con 4 volúmenes de etanol-acetona 1:1 durante toda la noche a -20°C y al pellet se le agregó 1ml de buffer de extracción ASB-14, se resuspendió y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml con perlas de vidrio para ser agitado a máxima velocidad en el vortex por 1 minuto, la fracción soluble se alicuotó en tubos eppendorf nuevos.
6. El sobrenadante precipitado se centrifugó a 13 200rpm a 4°C durante 20 minutos, los pelles obtenidos se resuspendieron en buffer de extracción ASB-14 para finalmente ser alicuotados en tubos eppendorf de 1.5ml nuevos.

Tabla 21. Componentes del buffer de extracción

---

7 M urea
2 M tiourea
2% CHAPS
2% ASB-14

---

En solución tampón Tris-HCl 30mM pH 8.5

## APÉNDICE II

### Desnaturalización de proteínas

Las proteínas son moléculas orgánicas que pueden describirse en función de sus niveles de organización, en este caso su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Cada tipo de molécula proteica posee en su estado nativo una forma tridimensional característica que es conocida como su conformación [41].

La adición de agentes desnaturizantes, incrementos o decrementos de temperatura y variaciones de pH provocan la desnaturalización de las proteínas, la cual consiste en la desorganización de la estructura nativa, el cambio que va de un arreglo estructurado a uno irregular y difuso en la cadena polipeptídica [42].

Los agentes desnaturizantes provocan la ruptura de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre las proteínas, así como la ruptura de enlaces disulfuro entre las cisteínas. En la tabla se muestran algunos ejemplos y su acción [3].

Tabla 22. Ejemplos de agentes desnaturizantes y su acción sobre las proteínas [3].

<b>Agentes desnaturizantes</b>	<b>Acción</b>	<b>Ejemplos</b>
Caotrópicos	Rompen puentes de hidrógeno e interacciones hidrofílicas lo que permite desplegar las proteínas, exponiendo los grupos ionizables a la solución	Urea Tiourea
Detergentes	Rompen interacciones hidrofóbicas, lo que permite la extracción y solubilización de las proteínas. Previenen la formación de agregados proteicos	CHAPS ABS-14 Triton X-100 SDS
Reductores	Rompen enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína, logrando el desplegamiento de la proteína	DTT

Se han observado muchos casos en que una molécula desplegada recupera su forma nativa, en un proceso que recibe el nombre de renaturalización. Esto sucede cuando las proteínas se encuentran en una solución con un pH y osmolaridad adecuada, favoreciendo la eliminación de los agentes desnaturizantes lo que permite que la proteína se pliegue nuevamente [42].

**XI. REFERENCIAS**

- [1] Martins, D., Menezes O., Farias, A. S., Horiuchu, R. S. O., Domingues, C. C., Paula, E., Marangoni, S., Gattaz, W. F., Dias-Neto, E. and Camillo, J., (2007). The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Briefings in functional genomics and proteomics*. 6:70-75.
- [2] Castellanos, L., González, L. J. y Padrón, G., *Proteómica*. pg. 367-378.
- [3] Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik, A. Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J. and Silberring, J., (2006). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography B*. 849:1-31.
- [4] Chevalier, F., (2010). Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome science*. 8:1-10.
- [5] Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J., (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4:3665-3685.
- [6] Westermeier, R., and Naven, T., (2002). *Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis.* (Tercera edición) República Federal de Alemania: Wiley-VCH. pg. 11-22, 233-236.
- [7] Friedman, D. B., Hoving, S. and Westermeier, R., (2009). Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 463:515-539.
- [8] Baggerman, G., Vierstraete, E., De Loof, A. and Schoofs, L., (2005). Gel-Based versus Gel-Free proteomics: A review. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 8:669-677.
- [9] Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P., (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales. *Instituto de Nacional Indigenista*. 16:13-20.

- [10] Cañas, A., Barzana, E., Owens, J. D. y Wachter C., (1993). La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia*. 44:219-229.
- [11] Wachter, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. and Owens J. D., (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentation. *Food Microbiology*. 17:252-256.
- [12] Ulloa, M. and Herrera, T. (1983). Mexican pozol, p. 226-223. En: K. H. Steinkraus (ed), Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker, N. York.
- [13] Paredes, L. O., Guevara, L. F. y Bello, P. L., (2008). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*. 92:60-70.
- [14] Vihinen , M. y Mäntsälä, P., (1989). Microbial amyolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 24: 329-418.
- [15] van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L., (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 94:137-155.
- [16] Wachter, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. and Owens, J. D., (1993). Sources of microorganism in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 9:269-274.
- [17] Nuraida, L., Wachter, C and Owens, J. D., (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 11:567-571.
- [18] Ampe, F., Ben, O. N. and Guyton, J. P., (1999). Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *The Society for Applied Microbiology*. 87:131-140.
- [19] Ampe, F., Ben, O. N., Moizan, C., Wachter, C. and Guyton, J. P., (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganism in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5464-5473.

- [20] Escalante, A., Wachter, C. y Farrés, A., (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 64:21-31.
- [21] Ben, O. N. and Ampe, F., (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3664-3673.
- [22] Rivera Noriega A., (2001). Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, 62 pp.
- [23] Díaz-Ruiz, G., Guyton, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyton, J. and Wachter, C., (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4367-4374.
- [24] Nielsen, E. J. and Borchert, V. T., (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1543:253-274.
- [25] Reddy, G., Altaf, Md. Naveena, B. J., Venkateshwar, M. and Vijay, K. E., (2008). Amyolytic bacterial lactic acid fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 26:22-34.
- [26] MacGregor, E. A., Janeček, S. and Svensson, B., (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1546:1-20.
- [27] Janeček, S. Svensson, B. and MacGregor, E. A., (2003). Relation between domain evolution, specificity and taxonomy of the  $\alpha$ -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *European Journal of Biochemistry*. 270:635-645.
- [28] Monteiro de Souza, P. and Pérola de Oliveira, M., (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 850-861.

- [29] Henrissat, B. and Davies, G., (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 7:637-644.
- [30] Svensson, B., Tovborg Jensen, M., Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Bønsager, B., Nielsen, P. K., Kramhøft, B., Praetorius-Ibba, M., Nøhr, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. and Drigues, H., (2000). Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biologia Bratislava*. 57/Suppl. 11-5-19.
- [31] Davies, G. and Henrissat, B., (1995). Structures and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3:853-859.
- [32] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, K. V. and Chauhan, B., (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38:1599-1616.
- [33] Giruad, E., Grosselin, L., Marin, B., Parada, J. L. and Raimbault, M., (1993). Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Biotechnology*. 75:276-282.
- [34] Miller, L. G., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- [35] Sánchez-Herrera, L., Ramos-Valdivia, A. C., de la Torre, M., Salgado, L. M. and Ponce-Noyola, T., (2007). Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Biotechnologically Relevant enzymes and proteins*. 77:589-595.
- [36] Cárdenas, A. C. En proceso.
- [37] Najafi, F. M., Deobagkar, D. and Deobagkar, D., (2005). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*. 41:349–354.
- [38] Agati, V., Guyton, J. P., Morlon-Guyton, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D. J., (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus*

---

*fermentum* from fermented doughs (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology*. 85:512-520.

[39] Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyton, J., Jore, J., Pintadoo, J. N., Juge and Guyton, J. P., (2000). Comparative characterization of complete and truncate forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3350-3356.

[40] Lacks, S. A. and Springhorn, S., (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecil sulfate. *Journal of Biological Chemistry*. 255: 7467-7473.

[41] Lehninger, A. L., (1983). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. (Séptima edición) Barcelona: Ediciones Omega. Pg. 59

[42] Creighton, T. E., (1990). Review article. Protein folding. *Biochemistry Journal*. 270: 1-16.