

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

**Establecimiento de un bioproceso para la producción de
oligosacáridos de diferente peso molecular por
*Aureobasidium pullulans***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en C. MARÍA ISABEL HERNÁNDEZ CASTILLO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ

DRA. MARÍA EUGENIA HIDALGO LARA

Tepetitla de Lárdizabal, Tlaxcala, Junio 2018

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María del Carmen Cruz López (CIBA-IPN)

Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo (CIBA-IPN)

Dr. Marlon Rojas López (CIBA-IPN)

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara (CINVESTAV-ZACATENCO)

Dr. Víctor Eric López y López (CIBA-IPN)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de _____ para examinar la tesis titulada:
Establecimiento de un bioproceso para la producción de oligosacáridos de diferente peso molecular por *Aureobasidium pullulans*

Presentada por el alumno:

HERNÁNDEZ
Apellido paterno

CASTILLO
Apellido materno

MARÍA ISABEL
Nombre(s)

Con registro:

B	1	3	1	1	5	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Dr. Victor Eric López y López

Dra. María del Carmen Cruz López

Dra. Fabiola Eloisa Jiménez Montejo

Dr. Marlon Rojas López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 12 de enero del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAXCALA en su sesión Ordinaria No. 01 celebrada el día 12 del mes de enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

HERNÁNDEZ

Apellido paterno

CASTILLO

Apellido materno

MARÍA ISABEL

Nombre (s)

Con registro:

B	1	3	1	1	5	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Establecimiento de un bioproceso para la producción de oligosacáridos de diferente peso molecular por *Aureobasidium pullulans*

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Establecimiento de las condiciones de fermentación para producir enzimas amilolíticas empleando la levadura *Aureobasidium pullulans* y la producción de oligosacáridos de diferente peso molecular a partir de la hidrólisis de almidón de cebada, usando extractos crudos, así como enzimas purificadas

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

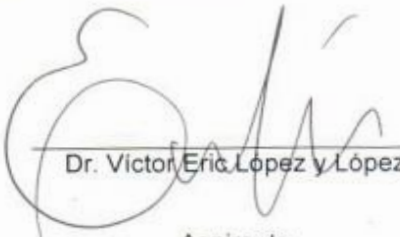
Dr. Víctor Eric López y López (CIBA-TLAXCALA) y Dra. María Eugenia Hidalgo Lara (CINVESTAV-IPN)

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIBA-IPN y en el Depto. de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis


Dr. Víctor Eric López y López

Aspirante


María Isabel Hernández Castillo


Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Presidente del Colegio


Dra. María Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, el día 24 del mes Mayo del año 2018, el (la) que suscribe María Isabel Hernández Castillo alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro B131155, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Víctor Eric López y López y cede los derechos del trabajo intitulado Establecimiento de un bioproceso para la , al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica isabel30hc@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Isabel Hernández Castillo



El presente trabajo se llevó a efecto en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-TLAXCALA) y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-ZACATENCO), del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Víctor Eric López y López y la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara.



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por la beca número 246766 asignada para de desarrollo de este proyecto.

Al financiamiento de proyectos de investigación de la Secretaría de Investigación y Posgrado, con Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) de los proyectos: SIP 20140389, SIP 20151569, SIP 20160209 y SIP 20170497

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, (CIBA-TLAXCALA) del Instituto Politécnico Nacional por permitirme cursar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-ZACATENCO), por la oportunidad de haber realizado una estancia de investigación que permitió complementar este proyecto.



Contenido

Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
Introducción.....	1
Capítulo 1. Antecedentes.....	3
1.1 Almidón: Estructura y composición química.....	3
1.2 Amilasas	5
1.2.1 Glucoamilasa (EC3.2.1.3).....	6
1.2.2 α -amilasa (EC3.2.1.1).....	7
1.2.3 α -glucosidasa (EC3.2.1.20)	8
1.2.3 β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	9
1.3 Hidrólisis enzimática de almidón	10
1.4 Caracterización de gránulos de almidón y análisis de la susceptibilidad enzimática mediante Microscopía electrónica de Barrido (SEM)	11
1.5 Potencial biotecnológico de <i>Aureobasidium pullulans</i>	14
1.5.1 Producción de enzimas amilolíticas por levaduras: <i>A. pullulans</i>	15
1.6 Producción de oligosacáridos	17
1.6.1 Maltooligosacáridos	20
Justificación.....	22
Hipótesis.....	23



Objetivo General 23

Objetivos Específicos 23

Capítulo 2. Materiales y métodos..... 24

2.1 Aislamiento de almidón a partir de cebada 24

2.2 Microorganismo y propagación en PDA y medio basado en almidón 26

2.3 Evaluación del crecimiento de *A. pullulans* en cultivo en matraz 27

2.4 Producción de enzimas amilolíticas por *A. pullulans* a nivel fermentador 27

2.5 Métodos analíticos 28

2.5.1 Cuantificación de glucosa 28

2.5.2 Azúcares reductores 28

2.5.3 Carbohidratos totales..... 28

2.6 Análisis de actividad enzimática de *A. pullulans* 28

2.6.1 Determinación de la actividad glucoamilasa 29

2.6.2 Determinación de la actividad α -amilasa 29

2.6.3 Determinación de la actividad α -glucosidasa..... 29

2.6.4 Determinación de la actividad β -glucosidasa..... 30

2.7 Electroforesis de proteínas 30

2.8 Zimograma 30

2.9 Obtención del extracto enzimático crudo y determinación de proteína 31

2.10 Purificación parcial de enzimas amilolítica producidas por *A. pullulans*..... 33

2.11 Identificación de proteínas con actividades amilolítica..... 34

2.12 Hidrólisis de almidón para la producción de oligosacáridos 35

2.13 Caracterización de los gránulos de almidón por Microscopía electrónica de Barrido (SEM) 35

Capítulo 3. Resultados y discusión 36

3.1 Propagación de *A. pullulans* en agar de papa y dextrosa (PDA) 36

3.2 Aislamiento de almidón a partir de cebada 37



3.3 Actividad de las enzimas producidas por <i>A. pullulans</i>	42
3.4 Cinética de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en cultivo a nivel matraz.	43
3.5 Cinética crecimiento de <i>A. pullulans</i> en cultivo a nivel fermentador.....	45
3.6 Actividad enzimática del extracto enzimático.....	50
3.7 Purificación parcial de enzimas amilolítica producidas por <i>A. pullulans</i>	51
3.8 Identificación de proteínas.....	58
3.9 Producción de oligosacáridos.....	63
3.10 Microscopía electrónica de Barrido (SEM) de almidón.....	64
Conclusiones	67
Referencias	68
Artículo: Aprovechamiento de almidón de cebada de mala calidad para la producción de enzimas amilolíticas por <i>Aureobasidium pullulans</i>	77



Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del almidón	4
Figura 2. Estructura de las principales enzimas amilolíticas.	6
Figura 3. Diagrama de hidrólisis del almidón por enzimas amilolíticas.....	11
Figura 4. Micrografías de almidón hidrolizado, usando una mezcla de glucoamilasa y α -amilasa a 0 h, 1 h y 24 h. Triticale (A), trigo (B) y maíz (C).	13
Figura 5. Ciclo de vida de las células polimórficas de <i>A. pullulans</i> NG, y los efectos de la nutrición y el pH. El ciclo de vida de la cepa NG se puede dividir en seis etapas. Las células tipo levadura (YL), células de tipo levadura blastosporas (YLB), las células hinchadas (SC), células septadas hinchadas (SSC), blastosporas de células hinchadas (SCB), estructura meristemática (MS), y clamidosporas (CH).	14
Figura 6. Demanda de oligosacáridos en Japón (toneladas/año).....	20
Figura 7. Diagrama de la extracción de almidón a partir de granos de cebada maltera mediante un proceso de molienda húmeda.....	25
Figura 8. Concentración del extracto enzimático crudo producido por <i>A. pullulans</i> durante la fermentación.....	32
Figura 9. Conservación de de <i>A. pullulans</i> en tubos inclinados con PDA.	36
Figura 10. Propagación de <i>A. pullulans</i> en medio PDA pH5.5 a diferentes tiempos: 24 h (a), 48h (b), 72h (c), 7 días (d), y 2 meses(e). Morfología típica de la levadura (f).....	37
Figura 11. Proceso de limpieza y obtención de harina: cebada con impurezas (a), cebada libre de impurezas (b). Perlado del grano de cebada: Licuadora utilizada para retirar la cascarilla (c), separación del grano y cascarilla (d), grano de cebada limpio (e), molienda (f) y harina (g).....	39



Figura 12. Proceso de extracción de almidón a partir de cebada, incluye: maceración (a), molienda húmeda (b), suspensión de almidón (c), centrifugación (d), separación de fases en pigmentos (e) y almidón (f). 40

Figura 13. Crecimiento de *A. pullulans* a 48 h en medio a base de almidón a pH 5.5 y una relación carbono nitrógeno, C:N de 8 (a) almidón de maíz, (b) Almidón soluble, (c) Almidón de cebada. Halos de hidrólisis de enzimas amilolíticas de *A. pullulans* en almidón de cebada (d) y (e)..... 42

Figura 14. Curva de crecimiento de *A. pullulans* en medio líquido basado en almidón de cebada a nivel matraz, actividad glucoamilasa y liberación de glucosa. 44

Figura 15. Actividad enzimática de *A. pullulans* durante la fermentación a nivel matraz. 44

Figura 16. Producción de glucosa, azúcares reductores y carbohidratos totales por *A. pullulans* en cultivo a nivel matraz. 45

Figura 17. Crecimiento celular de *A. pullulans*, actividad glucoamilasa y liberación de glucosa en cultivo a nivel fermentador. 47

Figura 18. Crecimiento celular de *A. pullulans*, actividad de glucoamilasa, α -amilasa y β -glucosidasa en cultivos a nivel fermentador. 48

Figura 19. Análisis electroforético (SDS-PAGE al 10 %). 1: Marcadores de peso molecular, 2: Extracto crudo (teñido con coomassie), 3: Zimograma (Extracto crudo). 50

Figura 20. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico (Unosphere Q), del extracto crudo usando buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5. 51

Figura 21. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico usando buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. Gradiente de KCl, actividad enzimática: glucoamilasa (a), α -amilasa (b), α -glucosidasa (c) y β -glucosidasa (d). 52

Figura 22. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo. 53



Figura 23. Perfil cromatográfico defiltración en gel, usando buffer de acetato 50 mM, pH 5.0. Actividad enzimática: glucoamilasa (a), α -amilasa (b), α -glucosidasa (c) y β -glucosidasa (d). 54

Figura 24. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo. 55

Figura 25. Perfil cromatográfico defiltración en gel, usando buffer de acetato 50 mM, pH 5.0. Actividad enzimática: glucoamilasa (a), α -amilasa (b), α -glucosidasa (c) y β -glucosidasa (d). 56

Figura 26. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo. 57

Figura 27. Análisis electroforético (SDS-PAGE al 10%) de la purificación de glucoamilasa (a) y α -glucosidasa (b). M: marcadores de peso molecular, EC: Extracto enzimático crudo, 2: C. intercambio iónico, 3: C. intercambio catiónico, 4: C. Filtración en gel. 57

Figura 28: Alineamiento múltiple de α -glucosidasas de cuatro variedades de *Aureobasidium: melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21). 59

Figura 29: Alineamiento múltiple de glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium: melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21). 60

Figura 30: Alineamiento múltiple de glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium: melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21). 62

..... 63



Figura 31. Análisis de los productos hidrólisis de almidón de cebada, usando fracciones de cromatografía de intercambio aniónico como fuente enzimática. M: estándares, glucosa (G1), maltosa (G2), maltotriosa (G3), maltotetraosa (G4), maltopentaosa (G5), maltohexaosa (G6) y maltoheptaosa (G7). EC: Extracto enzimático crudo. P1: 70-73, P2: 74-77, P3: 78-80, P4: 81-85, P5: 86-89, P6: 90-93, P7: 94-101 y P8: 102-120. C: control. 63

Figura 32. Micrografías SEM de almidón de cebada con tratamiento con HCl (a), sin tratamiento con HCl (b), distribución del tamaño de los gránulos (c)..... 65

Figura 33. Micrografías SEM de almidón de soluble de papa (a), distribución del tamaño de los gránulos (b)..... 66

Figura 34. Micrografías SEM de almidón de maíz (a), distribución del tamaño de los gránulos (b). 66



Índice de tablas

Tabla 1. Ramificación de amilopectina de diferentes almidones (%).....	5
Tabla 2. Relación de amilosa y amilopectina de diferentes cereales.....	5
Tabla 3. Glucoamilasas producidas por diferentes microorganismos.....	7
Tabla 4. α -amilasas producidas por diferentes microorganismos.....	8
Tabla 5. α -glucosidasas producidas por diferentes microorganismos.....	9
Tabla 6. β -glucosidasas producidas por diferentes microorganismos.....	10
Tabla 7. Levaduras productoras de enzimas amilolíticas.....	16
Tabla 8. Fuentes y aplicaciones de algunos oligosacáridos.....	18
Tabla 9. Monómeros y tipo de enlace de algunos oligosacáridos.....	19
Tabla 10. Composición del medio para crecimiento de <i>A. pullulans</i> (C:N 8).....	26
Tabla 11. Rendimientos en la etapa de limpieza de cebada maltera.....	41
Tabla 12. Rendimientos en la fase de extracción de almidón a partir de cebada maltera.....	41
Tabla 13. Resultados de diferentes fermentaciones con <i>A. pullulans</i> en medio basado en almidón de cebada.....	46
Tabla 14. Producción de amilasas por diferentes cepas de <i>A. pullulans</i> comparadas con la obtenidas en este trabajo.....	49
Tabla 15. Actividad enzimática del extracto crudo.....	50



Resumen

En este trabajo se extrajo almidón de cebada por el método de molienda húmeda con un rendimiento del 29 %, se utilizó como fuente de carbono para generar cultivos de *Aureobasidium pullulans* ATCC®15233™, a nivel matraz y fermentador para la producción de enzimas amilolíticas. Se obtuvieron las siguientes actividades enzimáticas: glucoamilasa de 193 U/ml a las 15 h, α -amilasa de 7.4 U/ml a las 30 h, α -glucosidasa de 8.1 U/ml en promedio de las 24 h a las 30 h y β -glucosidasa de 8.5 U/ml a las 24 h, siendo superiores a las que se han reportado hasta el momento para dicha levadura. Posteriormente fueron purificadas parcialmente una glucoamilasa (72 kDa) y α -glucosidasa (154 kDa) por métodos cromatográficos de intercambio aniónico y catiónico y filtración en gel, las fracciones que presentaron actividad enzimática y un perfil proteico similar fueron mezcladas y utilizadas como fuente enzimática para la producción de oligosacáridos a partir de la hidrólisis de almidón de tres fuentes: cebada, soluble de papa y maíz. Las enzimas hidrolizaron almidón de cebada para producir glucosa y oligosacáridos de diferente peso molecular desde maltosa hasta maltoheptaosa (G3-G7). En el presente trabajo se establecieron ciertas condiciones para la producción de enzimas amilolíticas y evaluar el perfil de producción de oligosacáridos a partir de tres fuentes de almidón, lo cual no ha sido descrito hasta ahora. Esto sugiere que el almidón de cebada de baja calidad puede ser utilizado como sustrato potencial para la obtención de productos de valor agregado.



Abstract

In this work barley starch was extracted by the method of wet milling with a yield of 29%, it was used as a carbon source to produce cultures of *Aureobasidium pullulans* ATCC®15233™, at the flask and fermentor level for the production of amylolytic enzymes. The following enzymatic activities were obtained: glucoamylase of 193 U/ml at 30 h, α -amylase of 7.4 U/ml at 30 h, α -glucosidase of 8.1 U/ml on average of 24 h 30 h and β -glucosidase of 8.5 U/ml at 24 h, being superior to those that have been reported so far for this yeast. Subsequently, a glucoamylase (72 kDa) and α -glucosidase (154 kDa) were partially purified by chromatographic methods of anionic and cationic exchange and gel filtration, the fractions that presented enzymatic activity and similar protein profile were mixed and used as an enzymatic source for the production of oligosaccharides from the hydrolysis of starch from three sources: barley, soluble potato and corn. The enzymes hydrolysed barley starch to produce glucose and oligosaccharides of different molecular weight from maltose to maltoheptaose (G3-G7). In the present work, certain conditions were established for the production of amylolytic enzymes and to evaluate the production profile of oligosaccharides from three sources of starch, which has not been described so far. This suggests that low quality barley starch can be used as a potential substrate for obtaining value-added products.



Introducción

En décadas anteriores se ha buscado una oportunidad de aprovechamiento tanto de residuos, como de materias primas que no cumplen con los requerimientos necesarios para procesos industriales para las cuales fueron producidos, con el propósito de aminorar el impacto ambiental reduciendo fuentes contaminantes y los costos en el tratamiento, así como la disposición de dichos residuos en la industria, además de evaluar la posibilidad de obtener productos de valor agregado a partir de éstos.

Un ejemplo de esto es la cebada maltera, la cual debe cumplir con especificaciones y parámetros para ser utilizada en el proceso de malteo para la producción de cerveza ya que este es su único mercado en México (Aguilar y Schwentesius, 2004). De acuerdo con la norma NMX-FF-043-SCFI-2003, una cebada de buena calidad debe cumplir con las siguientes especificaciones: humedad (11.5 % y 13.5 %), germinación mínima (85 %), grano dañado (máximo 10 %), peso hectolítrico mínimo (de 56 y 58 kg/hl para cebada de seis y dos hileras, respectivamente), y parámetros como color, olor y tamaño, los cuales son dependientes de las condiciones medioambientales que prevalecen durante el desarrollo y maduración del grano. Sin embargo, en México, cada año grandes cantidades de cebada que no cumplen con dichas especificaciones y parámetros son rechazadas por la industria maltera.

Esta cebada de baja calidad no tiene prácticamente otro nicho en el mercado, y suele ser utilizada como alimento para ganado, incluso puede ser considerada como desecho (Aguilar y Schwentesius 2004). En este sentido, y sabiendo que se han utilizado residuos agroindustriales con alto contenido de celulosa, hemicelulosa, xilano, lignina, pectina y almidón (bagazo de caña, residuos de uva, cáscara de avena y trigo, entre otros) como sustratos para producción y evaluación de sistemas



enzimáticos, principalmente de aquellas que son inducibles, entre las que destacan: las celulasas (Botella et al. 2005), las xilanasas, proteasas (Oliveira et al. 2006) y las pectinasas (Castilho et al. 2000). En el caso de la cebada es posible aprovechar el almidón que representa en promedio 53% del peso del grano (Vasanthan y Hoover 2009).

Por otra parte, se ha reportado que levaduras como: *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Saccharomycopsis*, *Lipomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Clavispora*, *Filobasidium* y *Aureobasidium* (Djekrif et al. 2015) producen enzimas amilolíticas. Particularmente, *Aureobasidium pullulans* produce al menos cuatro tipos de amilasas extracelulares usando diferentes sustratos para su inducción (Saha et al. 1993). Se pueden mencionar; glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa. Las amilasas son de gran importancia en aplicaciones biotecnológicas, no solo en la sacarificación de almidón, sino en diferentes industrias como la de alimentos, la textil, los biocombustibles y la papelera (Gupta et al. 2003, Rana et al. 2013).

Aunado a esto, es posible obtener productos de valor agregado a partir de la hidrólisis enzimática de almidón, principalmente glucosa, maltosa y oligosacáridos. Estos últimos se definen como polímeros de bajo peso molecular constituidos desde 2 hasta 10 unidades de monosacáridos (Rodrigues et al. 2018). Los oligosacáridos tienen múltiples funciones importantes en sistemas biológicos (Perugino et al, 2004). Dentro de las aplicaciones a nivel industrial; se emplean en la formulación de suplementos alimenticios y fármacos, como prebióticos, e incluso en fertilizantes orgánicos (Patel y Goyal, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue la producción de enzimas amilolíticas usando la levadura *A. pullulans* a partir de almidón de cebada de baja calidad como sustrato y el establecimiento de las condiciones de hidrólisis de almidón de distintas fuentes para la producción de oligosacáridos de diferente peso molecular.



Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Almidón: Estructura y composición química

Los polisacáridos o carbohidratos de alto peso molecular se encuentran de manera abundante en la naturaleza como fuentes de reserva energética, destacando la celulosa y almidón. Ambos consisten de monómeros de glucosa, los cuales están diferencialmente unidos para formar las cadenas del polímero: el almidón consiste de unidades de glucosa unidas por enlaces α -glucosídicos, mientras que, en celulosa la glucosa está unida por enlaces β -glucosídicos. Por lo tanto, representan importantes fuentes de energía para animales, plantas y microorganismos.

Estos polisacáridos son bioquímicamente hidrolizados por dos grupos de enzimas: el almidón por α -glucosidohidrolasas y la celulosa por β -glucosidohidrolasas. (Horváthová et al. 2000). Se almacenan en raíces, tubérculos y semillas principalmente. El almidón constituye la principal fuente alimenticia proveniente del alto consumo de cereales, tubérculos y raíces, por lo que se justifica cualquier alternativa enfocada a aumentar el valor agregado mejorando sus propiedades funcionales y nutricionales (Cozzolino et al. 2013). Se presenta en forma de gránulos que contienen polímeros de glucosa de cadena larga; generalmente tienen una forma redondeada, irregular y con tamaños que oscilan entre 2 y 100 μm , dependiendo de la especie vegetal (Robyt 2008).

La mayoría de los almidones están compuestos por dos moléculas unidas a través de enlaces glicosídicos, amilosa y amilopectina, por lo que es parcialmente cristalino e insoluble en agua a temperatura ambiente.

La amilosa es una cadena lineal compuesta por miles de unidades de glucosa con uniones glicosídicas α -1,4, forma una red tridimensional cuando se asocian las moléculas al enfriarse, siendo la responsable de la gelificación. Por otra parte, la amilopectina está conformada por una cadena de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 con ramificaciones α -1,6 cada 15-30 unidades de glucosa en la cadena (Vasanthan y Hoover, 2009) (Figura 1). El porcentaje de ramificación puede variar de acuerdo al origen botánico del almidón, como se observa en la tabla 1.

La relación de amilosa y amilopectina presentes en el almidón varía, dependiendo de la fuente. Se ha reportado que la amilopectina está presente como componente mayoritario en una relación de 1:3 (25% amilosa y 75% amilopectina). En la tabla 2 se presentan diferentes almidones y su composición en amilosa y amilopectina (Robyt, 2008).

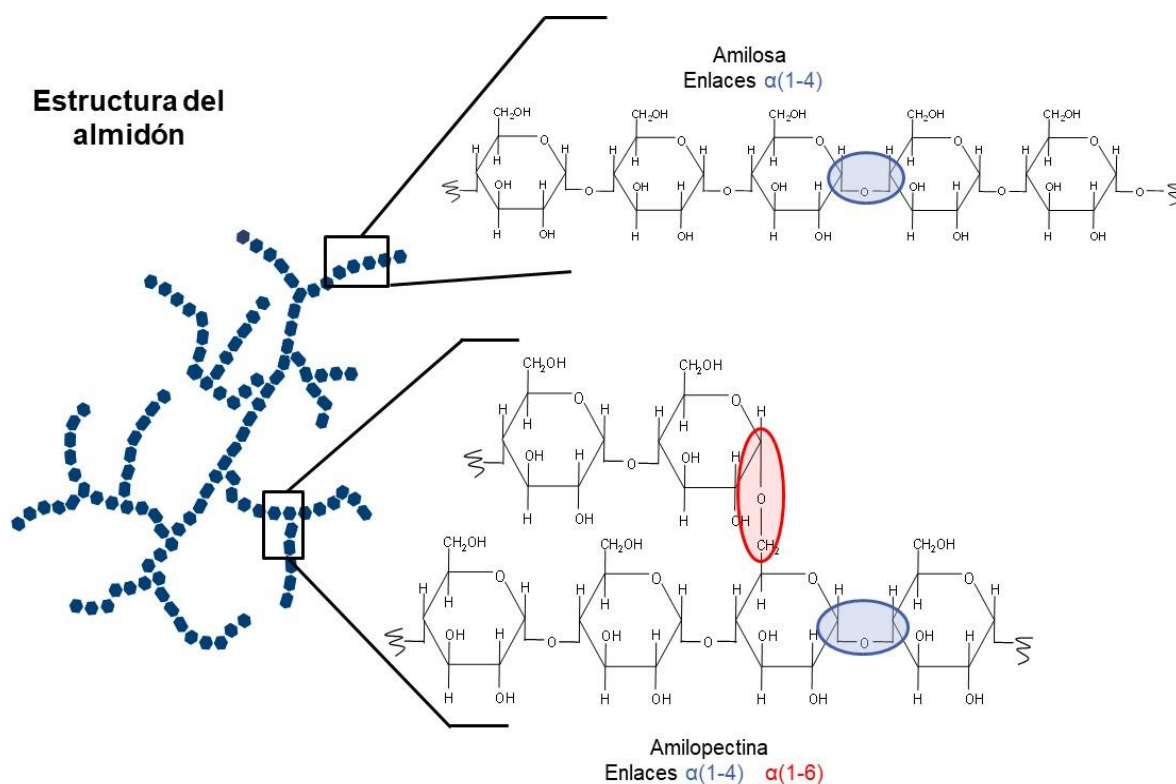


Figura 1. Estructura química del almidón



Tabla 1. Ramificación de amilopectina de diferentes almidones (%).

Amilopectina presente en:	% de ramificación
Maíz	4.2
Papa	4.5
Trigo	4.8
Cebada	5.0
Avena	5.2

Tabla 2. Relación de amilosa y amilopectina de diferentes cereales.

Almidón	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Maíz	25	75
Papa	22	78
Trigo	23	77
Cebada	20	80
Avena	16	84

1.2 Amilasas

La hidrólisis de almidón a productos de bajo peso molecular es catalizada por un grupo de enzimas denominadas amilasas. la mayoría tienen origen microbiano y tienen múltiples aplicaciones en diversas industrias tales como la de alimentos, fermentaciones, textil y papelería, entre otras. Dentro de las cuales se pueden mencionar la glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa (Figura 2). (Pandey et al., 2000) a continuación, se describen.

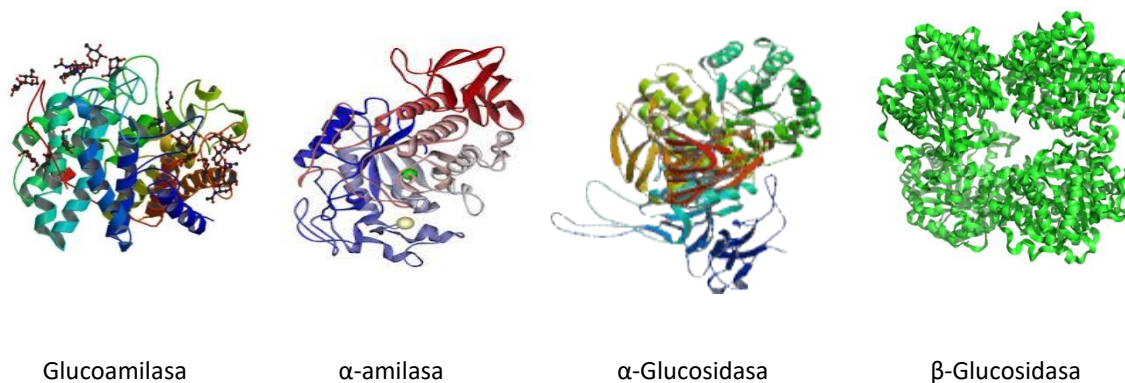


Figura 2. Estructura de las principales enzimas amilolíticas.

1.2.1 Glucoamilasa (EC3.2.1.3)

La función de la glucoamilasa es hidrolizar las cadenas de amilosa y amilopectina del almidón, rompiendo los enlaces α -1,4 y α -1,6 en los extremos no reductores (exoenzima) (Michelin et al. 2008), obteniendo como producto β -D-glucosa. Sus principales aplicaciones son: en la producción de etanol y la conversión enzimática del almidón, así como en la producción de jarabes de glucosa y jarabes de alta fructosa (Jennylynd y Byong, 1997). Se han obtenido distintas glucoamilasas a partir de una gran variedad microorganismos, aunque industrialmente son producidas a partir de hongos filamentosos, principalmente *Aspergillus* y *Rhizopus* (Kumar y Satyanarayana, 2009). Las glucoamilasas presentan distintas características dependiendo de la fuente de la cual provienen, algunas reportadas se incluyen en la tabla 3.

Tabla 3. Glucoamilasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso molecular (kDa)	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>A. niger</i>	62	5	70	Bagheri et al. 2014
<i>A. niveus</i>	77	5.0-5.5	65	Silva et al. 2009
<i>P. variotii</i>	86.5	5.0	55	Michelin et al. 2008
<i>T. lanuginosus</i>	75	4.4-5.6	70	Nguyen et al. 2002

1.2.2 α -amilasa (EC3.2.1.1)

Es una de las enzimas industriales más importantes (Gupta et al, 2003). La α -amilasa cataliza la hidrólisis al azar los enlaces glucosídicos α -1,4 de la región central de la cadena de amilosa y amilopectina, exceptuando las moléculas cercanas a la ramificación (endoenzima), obteniendo como resultado glucosa, maltosa, dextrinas y oligosacáridos de diferente tamaño con una configuración α (Michelin et al. 2010). Las α -amilasas puede ser obtenidas de varias fuentes tales como plantas, animales y microorganismos. Por ello, que la mayoría de estas enzimas usadas en la industria son de origen microbiano debido a distintos factores, por ejemplo, la alta actividad enzimática en diferentes condiciones; pH extremo, temperatura, osmolaridad y presión, etc. (Rana et al. 2013). Las α -amilasas con propósitos industriales son producidas principalmente por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae*. (Konsula et al. 2004). En la tabla 4 se presentan diferentes microorganismos productores de α -amilasas.

Tabla 4. α -amilasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso molecular (kDa)	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>Marinobacter sp.</i>	72	8.5	80	Kumar y Khare, 2012
<i>B. amyloliquefaciens</i>	58	6.5	55	Gangadharan et al. 2009
<i>Bacillus sp. YX-1</i>	56	5.0	40-50	Liu y Xu, 2008
<i>T. lanuginosus</i>	61	4.6–6.6	70	Nguyen et al. 2002

1.2.3 α -glucosidasa (EC3.2.1 .20)

La etapa final de hidrólisis del almidón es efectuada por la α -glucosidasa cataliza la ruptura de los enlaces α -1,4 en los oligosacáridos y dextrinas remanentes después de la degradación del almidón por la glucoamilasa, obteniéndose unidades de α -D-glucosa como producto final (exoenzima) (Thirunavukkarasu y Priest, 1984). Es producida por diversos microorganismos, ha sido purificada y caracterizada a partir de bacterias, levaduras y hongos. La síntesis de esta enzima depende de diversos factores tales como la edad del cultivo, la presencia de compuestos inductores en el medio y de los niveles intracelulares de nutrientes y minerales (De Palma et al. 2002). En la tabla 5 se presentan diferentes microorganismos productores de α -glucosidasas.

Tabla 5. α -glucosidasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso molecular (kDa)	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>S. tokodaii</i> Strain	70.5	4.0	95	Park et al. 2013
<i>C. albicans</i>	50	6.0-7.0	37	Frade et al. 2010
<i>S. pombe</i>	110	4.5	40	Okuyama et al. 2005
<i>E. histolytica</i>	55	6.5	45	Bravo et al. 2004

1.2.3 β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)

Las β -glucosidasas catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos β -1,4 (exoenzima) (Watanabe et al. 2016). Estas enzimas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, presentes en microorganismos, plantas y animales (Bhatia et al. 2002). Son de gran interés en la producción de biocombustibles como etanol, debido a su participación en la conversión de almidón y celulosa a glucosa, por lo que su potencial para la conversión de biomateriales renovables en biocombustibles le confiere importantes aplicaciones (Eyzaguirre et al. 2005; Yoon et al. 2008). Además, las β -glucosidasas tienen un papel clave en la liberación enzimática de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosídicos presentes en los zumos de frutas, mostos y vinos (Eyzaguirre et al. 2005).

Las β -glucosidasas fúngicas a partir de *Trichoderma*, *Penicillium* y especialmente *Aspergillus*, son consideradas como las más prometedoras en la producción de bioetanol y alimentos, por lo que son producidas a nivel industrial (Chen et al 2010). Debido a su potencial biotecnológico, las β -glucosidasas a partir de bacterias y hongos han sido purificadas y caracterizadas, algunas se indican en la tabla 6.

Tabla 6. β -glucosidasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso molecular (kDa)	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>A. oryzae</i>	150	4.5	50	Watanabe et al. 2016
<i>P. decumbens</i>	120	4.5-5.0	65-70	Chen et al 2010
<i>T. aurantiacus</i>	150	4.5	75	Ribeiro et al. 2007a
<i>A. pullulans</i>	331	4.0	80	Hayashi et al. 1999

1.3 Hidrólisis enzimática de almidón

El almidón es degradado a glucosa a través de una secuencial y cooperativa acción de las enzimas amilolíticas anteriormente mencionadas. Existen dos maneras principales en que una amilasa interacciona con polímero como sustrato (Horváthová et al. 2000).

La actividad exo de las exoenzimas, remueve una unidad del polímero de alguno de sus extremos (glucoamilasa y α -glucosidasa), mientras que las endoenzimas tienen la capacidad de romper enlaces internos en cualquier punto de la cadena del polímero (α -amilasa y β -glucosidasa) (Espitia 2009). En el diagrama de la figura 3 puede apreciarse la actividad de las diferentes enzimas amilolíticas sobre los enlaces presentes en la estructura del almidón, así como los principales productos obtenidos al realizar su actividad hidrolítica.

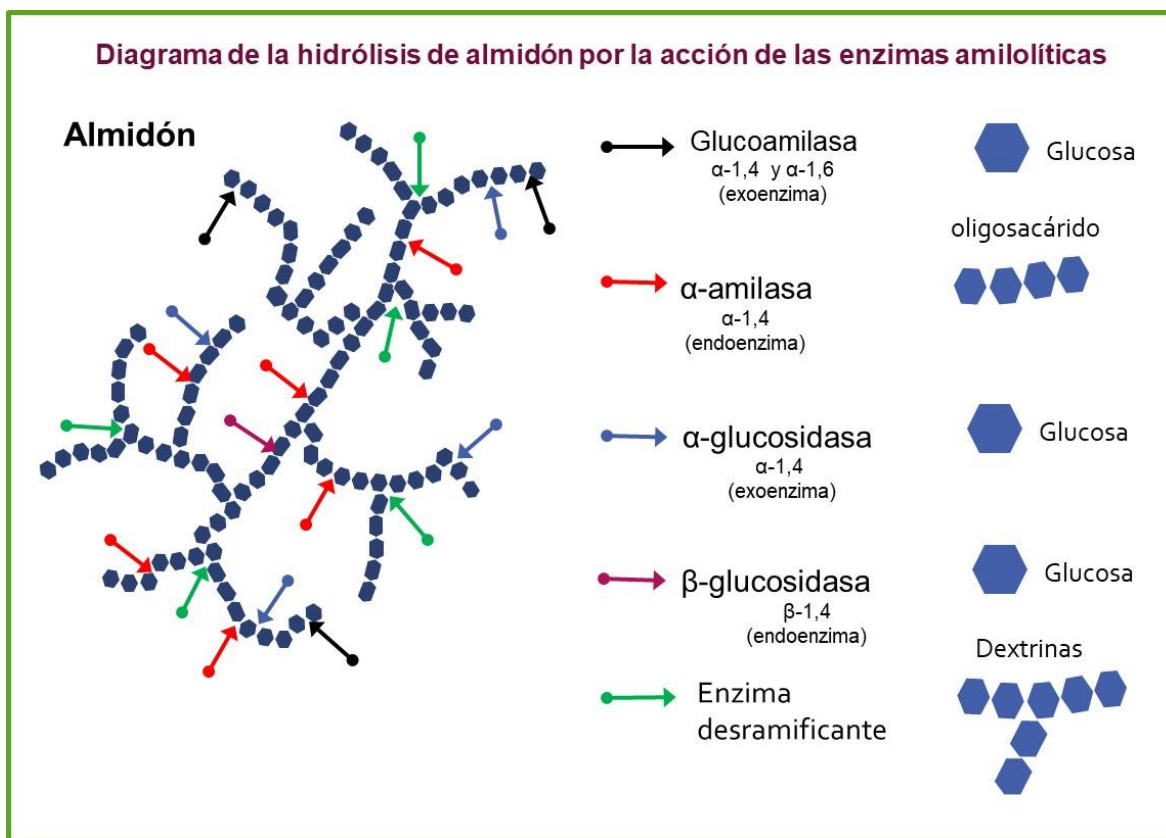


Figura 3. Diagrama de hidrólisis del almidón por enzimas amilolíticas.

1.4 Caracterización de gránulos de almidón y análisis de la susceptibilidad enzimática mediante Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite observar la morfología de diferentes materiales, incluidos aquellos de origen biológico. Ha sido ampliamente utilizada para analizar la forma y detalles de la superficie de varios almidones provenientes de cereales, así como la amilolisis, es decir, la hidrólisis enzimática usando amilasas; principalmente glucoamilasa y α -amilasa (Singh et al. 2003, Dura et al. 2014). La susceptibilidad de los gránulos de almidón a la hidrólisis depende de diversos factores, tales como: fuente botánica, tamaño, forma, estructura interna, la relación amilosa-amilopectina, porosidad, entre otros (Naguleswaran et al. 2013).



En general, las amilasas hidrolizan almidón en dos formas: 1) exocorrosión (erosión de la superficie, provocando fisuras y agujeros) y 2) endocorrosión (formación de canales, desde la superficie hasta el centro, resultando en la fragmentación del gránulo). Se han examinado los gránulos de triticale, trigo y maíz nativos e hidrolizados usando mezcla de glucoamilasa y α -amilasa a diferentes tiempos. Se observaron variaciones en los patrones de erosión sobre la superficie y se determinó que existe una acción sinérgica entre las enzimas (figura 4).

La α -amilasa hidroliza preferentemente las regiones amorfas, generando una cavidad en el centro del gránulo, mientras que la glucoamilasa hidroliza regiones amorfas y cristalinas del gránulo simultáneamente mediante la formación de agujeros superficiales (Naguleswaran et al. 2012). Así mismo, se han analizados gránulos de almidón de maíz y frijol antes y después del tratamiento con enzimas amilolíticas; a través de las micrografías SEM obtenidas se observó que el almidón de maíz hidrolizado presentó mayor presencia de poros comparado con el almidón de frijol. Mientras que el almidón hidrolizado de yuca mostró una superficie rugosa e incluso algunos de los gránulos todavía estaban intactos (Uthumporn et al. 2010).

Incluso se ha observado que la estructura porosa formada durante el ataque de las enzimas sería más grande y más profundo en gránulos como resultado de un extenso proceso de hidrólisis y también la presencia de poros y agujeros en la superficie de almidón nativo (O'Brien y Wang, 2008). Por lo tanto, un estudio de la morfología de los gránulos de diferentes almidones (maíz, papa y cebada), así como el efecto de las enzimas amilolíticas sobre éstos, es necesario para entender la susceptibilidad a la degradación enzimática para la obtención de productos derivados de almidón.

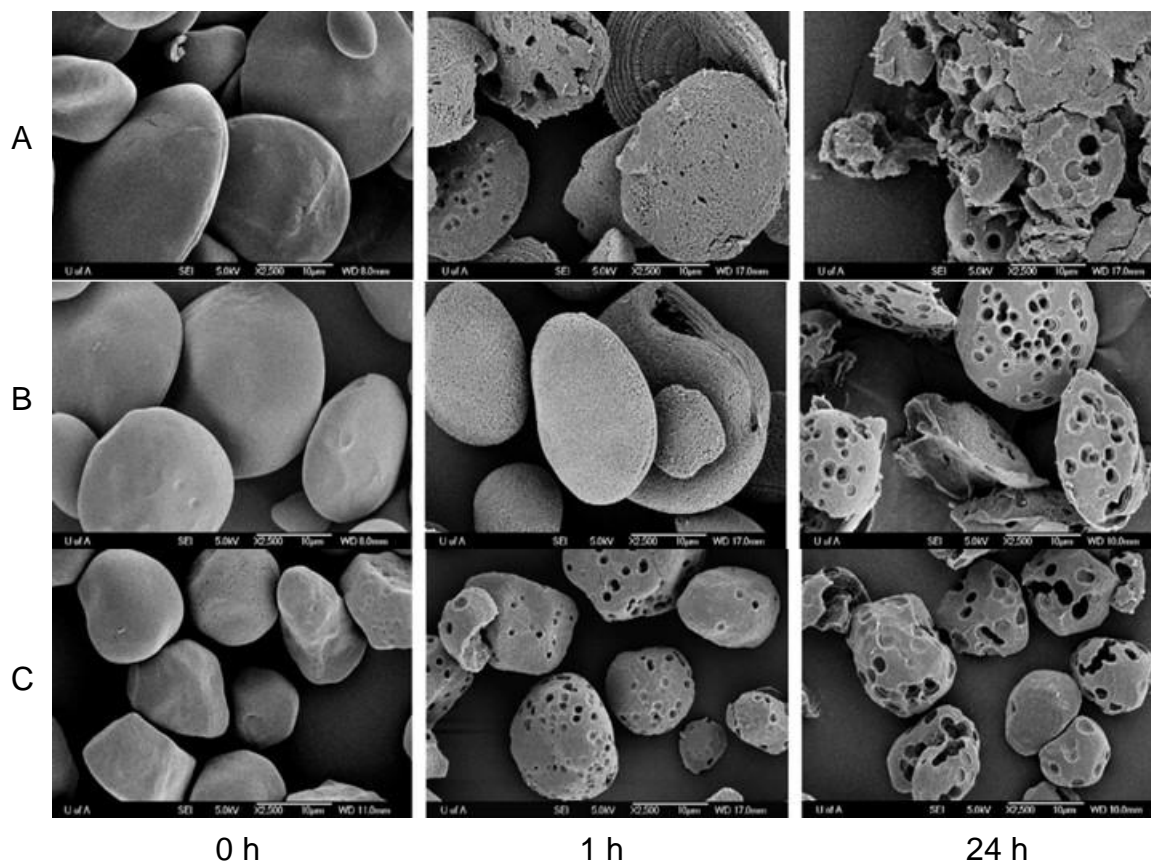


Figura 4. Micrografías de almidón hidrolizado, usando una mezcla de glucoamilasa y α -amilasa a 0 h, 1 h y 24 h. Triticale (A), trigo (B) y maíz (C).

1.5 Potencial biotecnológico de *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans es un hongo tipo levadura de distribución mundial, común en zonas templadas. Se aísla frecuentemente del suelo, hojas y madera de los árboles. Las temperaturas de crecimiento varían de 2 a 35 °C con una temperatura óptima a 30 °C (Zalar et al. 2008). En cultivo muestra diversas formas y colores, a 30 °C se desarrolla como colonias blancas o cremosas, pero también pueden ser amarillas o rosas, existen colonias que adquieren un color negro o gris oscuro, debido a la producción de melanina (Chi et al. 2009). Se han reportado cuatro variedades: *A. pullulans*, *A. melanogenum*, *A. subglaciale* y *A. namibiae* (Gostinčar et al. 2014). Dependiendo de la especie, *A. pullulans* presenta extrema variabilidad morfológica afectada por el pH y la disponibilidad de nutrientes, en la figura 5 se pueden observar dichas etapas del ciclo de vida de *A. pullulans* NG (Li et al. 2009), incluye; filamentos ramificados (F), células tipo levadura (YL), células hinchadas (SC), células septadas hinchadas (SSC), blastosporas de células hinchadas (SCB), estructura meristemática (MS), y clamidosporas (CH).

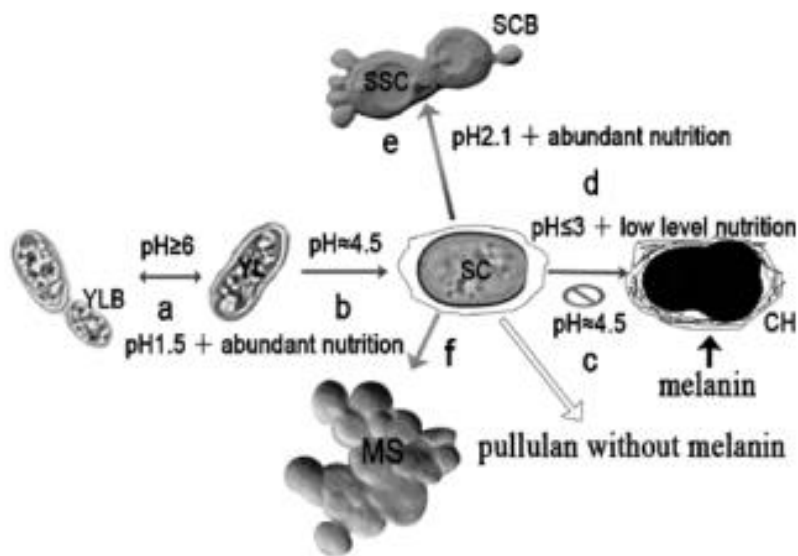


Figura 5. Ciclo de vida de las células polimórficas de *A. pullulans* NG, y los efectos de la nutrición y el pH. El ciclo de vida de la cepa NG se puede dividir en seis etapas. Las células tipo levadura (YL), células de tipo levadura blastosporas (YLB), las células hinchadas (SC), células septadas hinchadas (SSC), blastosporas de células hinchadas (SCB), estructura meristemática (MS), y clamidosporas (CH).



A. pullulans es conocido por la producción de pululano, un polisacárido de interés comercial conformado por repetidas unidades de maltotriosa, unidas por enlaces α -(1,6), mientras que las unidades internas de glucosa están conectadas con maltotriosa por enlaces glicosídicos α -(1,4) (Cheng et al. 2011). Dicho polisacárido tiene numerosas aplicaciones: en manufactura de películas y adhesivos utilizados en la industria farmacéutica, de alimentos y cosmética, en la, entre otras (Gostinčar et al. 2014, Chi et al. 2009).

Produce un sistema enzimático extracelular de amplio espectro que incluye: amilasas, celulasas, lipasas, proteasas, xilanasas, β -fructofuranosidasas, maltosiltransferasas, mannanasas y lacasas, entre otras (Chi et al. 2009). Se han purificado y caracterizado algunas de éstas enzimas: proteasa (Ma et al. 2007), lipasa (Liu et al. 2008a) y xilanasas (Li et al. 1993). De igual manera, ciertos genes codificantes para dichas enzimas han sido clonados y expresados en otros sistemas con el objetivo de aumentar su producción, por ejemplo, para proteasa (Ni et al. 2008), lipasa (Liu et al. 2008b) y xilanasas (Li y Ljungdahl, 1994).

Adicionalmente, algunas especies de *A. pullulans* se han reportado como tolerantes a la desecación, y otras han sido consideradas como un efectivo agente de biocontrol contra microorganismos no deseados, principalmente en frutos (Mounir et al. 2007). Por todo lo anterior, esta levadura tiene un importante potencial biotecnológico.

1.5.1 Producción de enzimas amilolíticas por levaduras: *A. pullulans*

La aplicación industrial de enzimas producidas por levaduras ha tenido un incremento, debido a que permiten facilitar los procesos y reducen los costos energéticos de los productos terminados. Algunas levaduras como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha* son recurrentemente usadas para la producción industrial de proteínas y enzimas (Djekrif et al. 2016).



En cuanto a la producción de enzimas amilolíticas extracelulares, el sistema es muy diverso, las principales son: glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa, pululanasa, y ciclodextrinasa, en la tabla 7 se mencionan algunas de las reportadas por Djekrif et al. 2016 en un trabajo de revisión.

Tabla 7. Levaduras productoras de enzimas amilolíticas.

Levadura	Enzima amilolítica
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	α -amilasa, Glucoamilasa
<i>Cryptococcus flavus</i>	α -amilasa
<i>Schwanniomyces castelli</i>	α -amilasa, Glucoamilasa
<i>Clavispora lusitaniae</i>	α -amilasa β -glucosidasa pululanasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	α -amilasa
<i>Candida utilis</i> , <i>Candida guilliermondi</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i>	α -amilasa
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululanasa Glucoamilasa α -glucosidasa α -amilasa

Como se observa en la tabla anterior se ha reportado que *A. pullulans* tiene la capacidad de producir diferentes enzimas amilolíticas que permiten la hidrólisis de almidón. Saha et al. (1993) reportaron que al utilizar diferentes fuentes de carbono (1 %) la levadura crece adecuadamente en todos los sustratos y produce amilasa y α -glucosidasa.



El nivel más alto de amilasa fue producido en el medio con amilopectina, mientras que la maltosa fue la mejor fuente de carbono para la producción de α -glucosidasa. Adicionalmente, Saha y Bothast 1993 evaluaron *A. pullulans* (NRRL Y-12794) y reportaron que produce específicamente una α -amilasa, una α -glucosidasa y dos formas de glucoamilasa (A y B), usando almidón soluble a 10g/l. El pH óptimo de α -amilasa, glucoamilasa A, glucoamilasa B y α -glucosidasa fue de 5.0, 4.5, 4.0-4.5 y 4.5, respectivamente. La temperatura óptima de estas enzimas fue de 55, 50-60, 65 y 65°C, respectivamente.

Posteriormente, Saha et al. (1994) reportaron la producción de una β -glucosidasa por la misma cepa de *A. pullulans*, evaluando diferentes fuentes de carbono para su inducción (salvado de maíz, celobiosa, xilosa, arabinosa, lactosa, maltosa, glucosa, xilano, celulosa, almidón soluble, entre otros). La actividad máxima se obtuvo con salvado de maíz, la enzima fue purificada y caracterizada, presentó un peso molecular de 340 kDa (dos subunidades de 165 kDa) y una actividad óptima a 75 °C y pH 4.5. Hasta ahora son pocos los reportes sobre la producción y aplicación de amilasas producidas por *A. pullulans*, es por ello que en este estudio se evalúa la obtención de productos de valor agregado a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de cebada.

1.6 Producción de oligosacáridos

Los carbohidratos son componentes estructurales y fuente de reserva energética a nivel celular. Además, están incluidas en procesos de reconocimiento celular, transducción de señales como adhesión celular, diferenciación, desarrollo y regulación, entre otros (Moracci et al. 2001). Están clasificados de acuerdo a su tamaño molecular o grado de polimerización en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. De manera específica, los oligosacáridos son polímeros de bajo peso molecular constituidos desde 2 hasta 10 unidades de monosacáridos (Rodrigues et al. 2018). Presentan propiedades que permiten su aplicación en la industria de alimentos, farmacéutica, agroquímicos y cosmética, entre otras.



Existen diferentes tipos, fuentes y aplicaciones de oligosacáridos, los más comunes se presentan en la tabla 8 (Patel y Goyal 2011). Sus propiedades funcionales varían dependiendo del monómero que los componen, al grado de polimerización y tipo de enlace por el cual están unidos, (Patel y Goyal 2011, tabla 9).

Tabla 8. Fuentes y aplicaciones de algunos oligosacáridos.

Oligosacáridos	Fuente	Aplicaciones
Isomaltooligosacáridos	<i>Bacillus circulans</i> T-3040	Previenen caries dentales, incrementa la población de <i>Bifidobacterium</i>
Oligosaccharides de harina de soya	Soya	Promueven la competencia contra patógenos, reduce el estrés oxidativo
Fructooligosacáridos	<i>Aspergillus, Fusarium, Arthrobacter, Aureobasidium, Gluconacetobacter, Bacillus</i> , extractos de plantas	Mejora la absorción de Ca y Mg, Previene infecciones urogenitales Efecto sobre el metabolismo de lípidos, reducen el riesgo de cáncer de colon
Glucooligosacáridos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-1299	Promueven la flora cutánea Son usados en la industria dermocosmética
Xilooligosacáridos	<i>Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, Bacillus, Streptomyces</i> , también a partir de trigo, cebada, entre otros.	Prebióticos, reguladores de crecimiento en plantas, antioxidantes, gelificantes. Usados en tratamiento de diabetes, arteriosclerosis y cáncer de colon
Ciclodextrinas	A partir de almidón por amilasas	Estabilizadores de compuestos volátiles, emulsificante, protectores contra oxidación y fotodegradación
Maltooligosacáridos	A partir de almidón por la acción de amilasas	Edulcorantes, Reducen los niveles de <i>Clostridium perfringens</i>



Tabla 9. Monómeros y tipo de enlace de algunos oligosacáridos.

Oligosacáridos	Monómero	Tipo de enlace
Isomaltooligosacáridos	(Glucosa) <i>n</i>	α -(1,6)
Oligosacáridos de harina de soya	(Galactosa) <i>n</i> -glucosa-fructosa	α -(1,6)- α -(1,2)- β -fructosa
Fructooligosacáridos)	(Fructosa) <i>n</i> -glucosa	β -(2, 1) y α -(1,2)
Galactooligosacáridos	(Galactosa) <i>n</i> -glucosa a	α -(1,4) y β -(1, 4)
Xilooligosacáridos	(Xilosa) <i>n</i>	β -(1, 4)
Ciclodextrinas	D-glucosa cíclica	α -(1,4)
Maltooligosacáridos	(Glucosa) <i>n</i>	α -(1,4)

Los métodos de producción de oligosacáridos están basados principalmente en la hidrólisis parcial de polisacáridos o en la síntesis a partir de precursores con menor grado de polimerización. Dichos procesos involucran dos clases de enzimas, las glicosilhidrolasas y las glicosiltransferasas, respectivamente.

Se ha reportado la obtención de oligosacáridos como: xilooligosacáridos (XOS), maltooligosacáridos (MOS), fructooligosacáridos (FOS), glucooligosacáridos (GOS) y ciclodextrinas (CDs), entre otros, mediante hidrólisis enzimática de polisacáridos (Talens et al. 2016). La demanda de oligosacáridos a nivel industrial en Japón, se presenta en la figura 6, destacando los oligosacáridos a partir de almidón los cuales son unos de los más solicitados (Nakakuki, 2003).

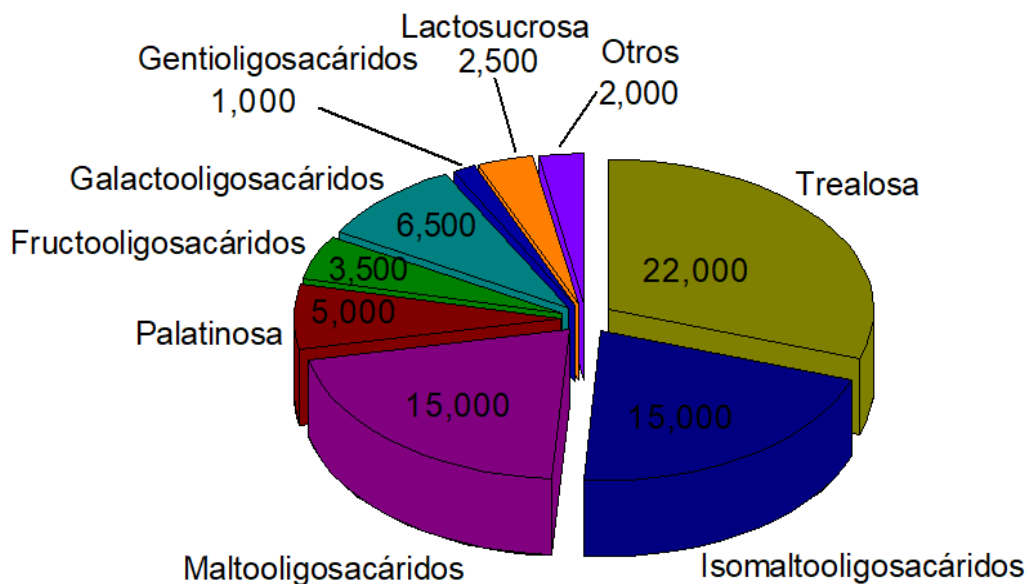


Figura 6. Demanda de oligosacáridos en Japón (toneladas/año).

1.6.1 Maltooligosacáridos

Los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de almidón, incluyen maltooligosacáridos; tienen únicamente enlaces α -(1,4), isomaltooligosacáridos; son ramificados y contienen enlaces α -(1,4) y α -(1,6), y ciclodextrinas; son cíclicos con enlaces α -(1,4) (Nakakuki, 2003). A su vez, dependiendo del grado de polimerización, es decir, unidades de glucosa (G), los maltooligosacáridos se pueden clasificar en maltosa (G2), maltotriosa (G3), maltotetraosa (G4), maltopentaosa (G5), maltohexaosa (G6), maltoheptaosa (G7) y así sucesivamente (Moon y Cho 1997).

Tienen aplicaciones en la industria de alimentos debido a sus propiedades edulcorantes (baja dulzura), capacidad de retención de agua, agentes de recubrimiento, proveedores de viscosidad, portadores de sabor, agentes anti-higroscópicos e inhibidores de la cristalización. Además, han sido evaluados como prebióticos (Duedahl et al. 2000, Nagarajan et al. 2006).



Por lo tanto, la producción de enzimas amilolíticas que sean capaces de formar maltooligosacáridos es de gran interés debido a que el mercado mundial continua en crecimiento, es por ello que surge la necesidad de implementar procesos escalables para su producción a partir de fuentes renovables y de bajo costo.



Justificación

Aureobasidium pullulans es una de las pocas levaduras capaces de utilizar almidón como fuente de carbono para su crecimiento, debido a la capacidad de producir enzimas amilolíticas las cuales tienen gran demanda en diversas industrias comolotextil, papelera, alimentos, entre otras. Las amilasas producidas por *A. pullulans* destacan las glucoamilasas, α -amilasas, α -glucosidasas y β -glucosidasas. Estas enzimas en conjunto, hidolizan almidón y como producto final se obtiene glucosa y oligosacáridos dependiendo de la fuente. Se ha observado que se producen oligosacáridos de diferente peso molecular, los cuales pueden tener diversas aplicaciones en las industrias de alimentos, textil, papeleras y farmacéutica. Dichos productos tienen altos costos en el mercado debido a que se obtienen por métodos complejos. Por lo que la síntesis enzimática representa la oportunidad de generar productos de alto valor agregado a partir de materias primas baratas como son los almidones de diversas fuentes.

Hasta el momento no ha sido descrita la producción de oligosacáridos por enzimas producidas de *A. pullulans*. Por lo que en el presente estudio se establecerán las condiciones de producción de enzimas amilolíticas a partir de almidón de cebada como fuente de carbono y la evaluación del perfil de producción de oligosacáridos de diferente peso molecular con el extracto crudo y las enzimas parcialmente purificadas.



Hipótesis

El perfil de producción de oligosacáridos será mayor empleando las enzimas amilolíticas purificadas.

Objetivo General

Establecer un bioproceso para la producción de oligosacáridos de diferente peso molecular utilizando *Aureobasidium pullulans*.

Objetivos Específicos

1. Producir extractos enzimáticos por *Aureobasidium pullulans* a partir de almidón de cebada en cultivos en lote.
2. Evaluar los perfiles de actividad enzimática de sobrenadantes libres de células.
3. Purificar parcialmente las diferentes enzimas amilolíticas.
4. Caracterizar bioquímicamente las enzimas obtenidas.
5. Producir oligosacáridos de diferente peso molecular con enzimas purificadas.



Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento de almidón a partir de cebada

En México no se comercializa el almidón de cebada, debido que la principal aplicación del grano es en el proceso de malteado para la elaboración de cerveza (Aguilar y Schwentesius, 2004), es por eso que se realizó un proceso de aislamiento de almidón con adecuaciones para granos de cebada (Wang y Wang, 2004). El aislamiento de almidón debe lograrse sin provocar alguna modificación significativa de su estructura y que este sea obtenido en cantidades suficientes. Los procesos para la extracción de almidón a partir de cereales son denominados de molienda húmeda (Quintos et al. 2009).

El grano es remojado en disoluciones con diversos compuestos químicos que tienen la finalidad de impedir el crecimiento de microorganismos y romper la matriz proteica que está ligada con los gránulos de almidón. Además, se usa agua como vínculo para lograr la conducción, separación y purificación de este importante carbohidrato (Uthumporn et al. 2012).

El diagrama de la figura 7, muestra de manera general el proceso de aislamiento de almidón a partir de granos de cebada que se realizó en este trabajo. El almidón obtenido se utilizó como fuente de carbono durante las cinéticas a nivel matraz y fermentador.

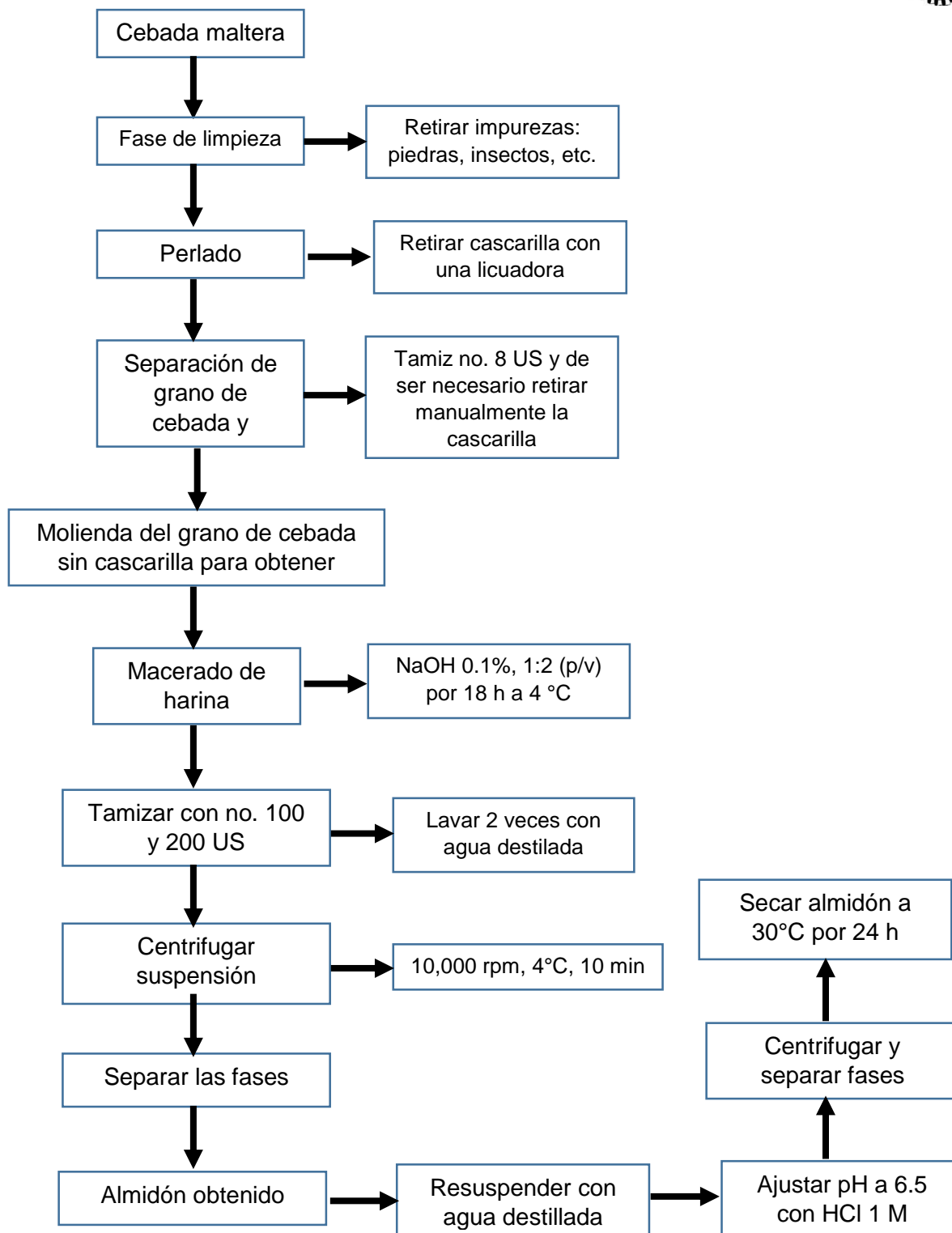


Figura 7. Diagrama de la extracción de almidón a partir de granos de cebada maltera mediante un proceso de molienda húmeda.



2.2 Microorganismo y propagación en PDA y medio basado en almidón

En este proyecto los todos los experimentos se llevaron a cabo usando la cepa de la levadura *Aureobasidium pullulans* ATCC®15233™, se propagó en agar de papa y dextrosa (PDA), preparado de acuerdo al fabricante en tubo inclinado y en placa a pH 5.5, se incubó a 30°C y se realizaron observaciones durante 7 días. Se conservó resemebrando periódicamente cada 30 días en el mismo medio.

Con el objetivo de observar el crecimiento de *A. pullulans* en un medio a base de almidón, se preparó un medio sólido con almidón de cebada (previamente extraído), almidón soluble de papa y almidón de maíz, todos con una relación C:N de 8, a pH 5.5 y los componentes mencionados en la tabla 10 (Hernández 2011). Se sembró *A. pullulans* por estría cruzada y en pozos, se incubó a 30 °C.

Tabla 10. Composición del medio para crecimiento de *A. pullulans* (C:N 8).

Componente	Concentración (g/l)
Almidón	50
NH ₄ Cl	8.6
Extracto de levadura	5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	0.3
CaCO ₃	5
Tiamina	0.001
Agar bacteriológico	4



2.3 Evaluación del crecimiento de *A. pullulans* en cultivo en matraz

Se realizó la cinética de crecimiento de *A. pullulans* en un medio líquido basado en almidón de cebada, pH 5.5, con la composición presentada en la tabla 10 (exceptuando el agar). Para esto se inoculó los matrazes con 250 ml de medio, usando un inóculo de 5×10^7 células/ml. Se mantuvieron en agitación a 180 rpm, a 30°C y se tomó una muestra cada 6 h, desde 0 h hasta 54 h para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer por duplicado y hacer observaciones morfológicas en un microscopio marca Olympus modelo BX51, usando un objetivo de 40x.

2.4 Producción de enzimas amilolíticas por *A. pullulans* a nivel fermentador

Para la producción de enzimas amilolíticas por *A. pullulans*, se desarrollaron cultivos por lote a nivel fermentador. Se propagó en placa con medio PDA, pH 5.5, a 30°C, durante 24 h, se estandarizó el inóculo con 5×10^5 células/ml, las cuales fueron transferidas a un matraz con 200 ml de medio líquido basado en almidón de cebada, pH 5.5 y fueron incubadas a 30°C, a 200 rpm durante 18 h.

Posteriormente se inoculó el fermentador y se desarrolló la cinética bajo las siguientes condiciones: se usó un equipo Sartorius BIOSTAT® Aplus, volumen de operación de 4L de medio con una relación C:N de 8 (tabla 10), 30 °C, 600 rpm, 1 vvm (volumen de aire/ volumen de medio) y pH 5.5 controlado automáticamente con ácido fosfórico e hidróxido de sodio. Se tomó muestra cada 3 h y se realizaron cuentas celulares en cámara de Neubauer por duplicado y se conservaron para su posterior procesamiento.



2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Cuantificación de glucosa

La concentración de glucosa durante la cinética se determinó por medio de un Analizador Bioquímico YSI (2700 Select), basado en el método enzimático glucosa oxidasa. De las muestras de fermentación, se midió 1 ml y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 10 min; el sobrenadante fue utilizado para el análisis.

2.5.2 Azúcares reductores

Se empleó el método colorimétrico ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de las muestras tomadas durante la fermentación se midió 0.5 ml de sobrenadante y se le agregó 0.5 ml de reactivo DNS se colocó a baño maría por 5 min, se adicionó 1 ml de agua destilada, se dejó reposar 5 min y se midió la absorbancia del color formado a 540 nm en un espectrofotómetro (Miller, 1959).

2.5.3 Carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales se realizó empleando la técnica de fenol-sulfúrico. Se utilizó el sobrenadante de las muestras de la fermentación, se tomó 1 ml de solución de la muestra, se le agregó 0.6 ml de solución de fenol al 5% (p/v) y se adicionaron 3.6 ml de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar la reacción por 30 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 490 nm (Nielsen, 2010).

2.6 Análisis de actividad enzimática de *A. pullulans*

Las muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación se centrifugaron a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 min, y el sobrenadante (extracto crudo) se usó para realizar los ensayos enzimáticos.



2.6.1 Determinación de la actividad glucoamilasa

La actividad de glucoamilasa se realizó preparando una mezcla de reacción que contenía 1 ml de una solución de 10 g/l de almidón soluble en una solución amortiguadora de acetato 0.2 M pH 4.5 y 0.1 ml de extracto enzimático. Se incubó a 60 °C por 30 min, se centrifugó 7 min, 10, 000 rpm, y 4 °C.

La concentración de glucosa se determinó en un analizador bioquímico (YSI 2700 Select) basado en el método de la glucosa oxidasa. Una unidad de actividad de glucoamilasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de azúcares reductores (glucosa) por minuto bajo las condiciones de ensayo (Li et al. 2007a).

2.6.2 Determinación de la actividad α -amilasa

El ensayo se realizó con una mezcla de reacción de 250 μ l de solución amortiguadora de acetato 0.2 M, pH 4.5, 250 μ l de *p*-nitrofenil- α -D-maltósido, 2 mM (Sigma Aldrich®) y 50 μ l de extracto enzimático. Se incubó durante 30 min a 70 °C; la reacción se detuvo adicionando 1 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2 M y el nitrofenol liberado se midió por absorción a 410 nm. Una unidad α -amilasa fue definida como la concentración de enzima que libera 1 μ mol de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Silva et al. 2005).

2.6.3 Determinación de la actividad α -glucosidasa

Se realizó con una mezcla de reacción de 250 μ l de solución amortiguadora de acetato 0.2 mol/l, pH 4.0, 250 μ l de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido 5 mM (Sigma Aldrich®) y 50 μ l de extracto enzimático. Después de incubar a 60 °C por 30 min, la reacción se detuvo adicionando 1 ml de Na_2CO_3 , 2 M y el nitrofenol liberado se midió por absorción a 410 nm. Una unidad α -D-glucosidasa fue definida como la concentración de enzima que libera 1 μ mol de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Saha et al. 1993a).



2.6.4 Determinación de la actividad β -glucosidasa

Para determinar la actividad, se preparó una mezcla de reacción de 250 μ l de solución amortiguadora 0.2 mol/l, pH 4.5, 250 μ l *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 4 mM (Sigma Aldrich®) y 50 μ l de extracto enzimático. Después de incubar a 60 °C por 30 min, la reacción se detuvo adicionando 1 ml de Na₂CO₃, 2 M y el color fue medido a 410 nm. Una unidad de β -glucosidasa fue definida como la concentración de enzima que libera 1 μ mol de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Ribeiro et al. 2007).

2.7 Electroforesis de proteínas

Para analizar el perfil electroforético del extracto crudo la electroforesis en geles de poliacrilamida fue realizada bajo condiciones desnaturalizantes (10% PAGE) de acuerdo al protocolo reportado (Laemmli, 1970). Los marcadores de peso molecular fueron miosina (200 kDa); galactosidasa (116 kDa); fosforilasa (97.4 kDa) albumina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), tripsina (21.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa). La proteína fue teñida con azul de Coomassie (R-250 Bio-Rad).

2.8 Zimograma

El zimograma fue realizado preparando un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito Laemmli, 1970, con algunas modificaciones. El gel fue copolimerizado con una solución al 1% (m/v) de almidón soluble de papa (Sigma-Adrich®).

Las muestras de proteína fueron mezcladas con buffer de carga y 2-mercaptoethanol e incubadas a 37°C durante 10 min. Se cargaron en el gel, al igual que el marcador de peso molecular y se desarrolló la electroforesis a 4°C, durante 2 h a 100 V. Posteriormente, las proteínas fueron renaturalizadas incubando el gel con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 2.5 % (v/v) en buffer de acetato pH 4.5, durante 1 h en agitación a 30 rpm.

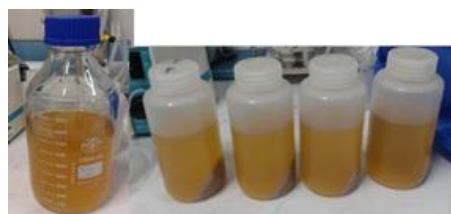


Luego, el gel fue incubado en el mismo buffer a 40°C durante 2 h, sin agitación. Las proteínas fueron visualizadas al teñirlas con azul de Coomassie (R-250 Bio-Rad). El gel fue desteñado e inmediatamente teñido con solución de Lugol y agitado a 30 rpm por 5 min a temperatura ambiente para observar las zonas claras, que contrastan con el color café del gel, asociadas a la hidrólisis de almidón por las enzimas amilolíticas presentes (Martínez et al. 2000; Cano et al. 2017)

2.9 Obtención del extracto enzimático crudo y determinación de proteína

El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, durante 15 min, para retirar las células y el almidón residual. El sobrenadante obtenido se filtró usando una membrana de 0,45 µm y se ultrafiltró, con un equipo Sartocan® Slice 200 Holder usando una membrana de tamaño de poro de 50 kDa (Figura 8).

El extracto liofilizado (0.016 mBar, -52 °C), fue utilizado como fuente enzimática en ensayos posteriores. La concentración de proteína en el extracto enzimático se determinó por el método de Lowry (1951) usando como referencia albúmina de suero bovino (BSA) para generar la curva de calibración con un coeficiente de correlación de 0.9998.



Centrifugación
10,000 rpm, 10 min, 4°C



Microfiltración (45 μ)



Ultrafiltración con membranas de 100 kD, 50kD y 30kD

Figura 8. Concentración del extracto enzimático crudo producido por *A. pullulans* durante la fermentación.



2.10 Purificación parcial de enzimas amilolítica producidas por *A. pullulans*

La separación y purificación parcial de las amilisas se realizó con una combinación de técnicas cromatográficas que incluyeron intercambio aniónico, intercambio catiónico y filtración en gel. Las condiciones se describen a continuación:

Diálisis. Se preparó una solución del extracto liofilizado y se dializó durante toda la noche contra un buffer Tris-HCl pH 7.5, 20 mM (glicerol al 15 % y PMSF 100 mM) en una relación 1:20. Después se determinó la concentración de proteína y actividad enzimática.

Cromatografía de intercambio aniónico. El dializado se inyectó a una columna cromatográfica Unosphere™ Q (Bio-Rad), equilibrada previamente con un buffer Tris-HCl pH 7.5 ,20 mM (glicerol al 15 % y PMSF 100 mM). La elución se realizó con un gradiente de concentración de KCl de 0.02 M a 0.5 M, en el mismo buffer con un flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, a las cuales se les midió la absorbancia a 280 nm; a las fracciones con mayor absorbancia se les determinó la actividad enzimática glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa (Michelin et al. 2008, 2010). Las fracciones que mostraron actividad enzimática se mezclaron en un pool (P) y se utilizaron para la siguiente etapa de purificación.

Cromatografía de intercambio catiónico. El pool (P) se dializó contra un buffer de acetato 50 Mm, pH 5.0 (glicerol al 15 % y PMSF 100 mM) en una relación 1:20 durante toda la noche. Posteriormente, se inyectó a una columna cromatográfica Unosphere™ S (Bio-Rad), equilibrada con el mismo buffer. La elución se realizó con un gradiente de concentración de KCl de 0.02 M a 0.5 M, en el mismo buffer con un flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, se midió la absorbancia a 280 nm y a las fracciones con mayor absorbancia se les determinó la actividad enzimática glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa. Las fracciones que mostraron actividad enzimática se mezclaron en un pool (P) y se utilizaron para la siguiente etapa de purificación (Hayashi et al. 1999, Kumar y Khare 2012).



Filtración en gel. El pool (P) se dializó contra un buffer de acetato 50 mM, pH 5.0 con glicerol al 3%, durante toda la noche y se inyectó a una columna de filtración en gel Bio-Gel® P-100 (Bio-Rad) equilibrada con el mismo buffer. La elusión se realizó con el mismo buffer a un flujo de 0.2 ml/min. Se obtuvieron fracciones de 1.2 ml, se les midió la absorbancia a 280 nm. A las fracciones con mayor absorbancia se les determinó la actividad enzimática glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa (Nguyen et al. 2002, Haifeng et al. 2007). En cada etapa de separación se realizó el análisis electroforético, el zimograma y los ensayos de hidrólisis de almidón para la producción de oligosacáridos.

2.11 Identificación de proteínas con actividades amilolítica

De acuerdo al perfil proteico y el zimograma, en el extracto enzimático crudo están presentes tres proteínas con actividad amilolítica. Por lo que fueron secuenciadas parcialmente utilizando el servicio de identificación de proteínas de la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Las muestras se prepararon en un gel de acrilamida al 10%, bajo los protocolos establecidos y se conservó en una solución fijadora de ácido acético al 7% hasta que fue procesado por el personal del laboratorio. Se cortaron manualmente las bandas asociadas a las proteínas de interés y fueron reducidas con Ditioneitol (DTT) 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100 mM y desteñidas una solución al 50% (v/v) de acetonitrilo y carbonato de amonio 50 mM (ACN: NH_4HCO_3).

Las proteínas se digirieron durante 18 h a 37 °C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:H₂O:ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló utilizando una columna C18 (ZipTipC18).

La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α -ciano, y se analizaron en un espectrómetro MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66% usando como base específica *Aureobasidium pullulans*.



2.12 Hidrólisis de almidón para la producción de oligosacáridos

Para evaluar la actividad de las enzimas amilolíticas producidas por *A. pullulans*, se realizaron ensayos de hidrólisis usando almidón de cebada (AC) obtenido en este trabajo, almidón soluble de papa (AS), S2004, Sigmal-Adrich® y almidón de maíz (AM) de Ingredion S. A. de C. V.

La mezcla de reacción consistió en 500 µl de solución de almidón y 50 µl de extracto enzimático y de cada fracción de las tres etapas de purificación, incubándose durante 30 min, agitando a 200 rpm a 60 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm y 4 °C.

Los productos de hidólisis del almidón fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés); 2 µl de cada muestra se depositó en una placa de sílica gel 60 F254 (Merck). El sistema de elución se preparó con butanol-etanol-agua-ácido acético (4:4:2:0.5 v/v/v/v), y se utilizaron glucosa (G1), maltosa (G2), maltotriosa (G3), maltotetraosa (G4), maltopentaosa (G5), maltohexaosa (G6) y maltoheptaosa (G7) como estándares. Los productos fueron revelados rociando la placa con ácido sulfúrico en metanol al 10 % (v/v) y calentando a 100 °C en un horno hasta la aparición de manchas de revelado (“spots”) de color café que indican la presencia de glucosa y oligosacáridos (Sarian et al. 2012).

2.13 Caracterización de los gránulos de almidón por Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Para la caracterización de los gránulos de almidón de cebada, soluble de papa y maíz se utilizó el polvo más fino para depositarlo en la cinta de carbón adherida al porta muestras. Al tratarse de muestras no conductoras fue necesario aplicarles un recubrimiento con oro sublimado, se utilizó un metalizador Desk® V, Jeol. Posteriormente se realizaron las observaciones en un microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV, Marca Jeol, USA, ubicado en los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Propagación de *A. pullulans* en agar de papa y dextrosa (PDA)

En la figura 9 y 10 se presentan imágenes de los tubos y las placas sembradas en PDA, respectivamente, las cuales muestran diferencias importantes en cuanto al crecimiento de *A. pullulans* con respecto del tiempo. A partir de 24 h es posible observar un buen crecimiento. Así como a las 48 h. Sin embargo, a partir de 72 h es apreciable la presencia de una pigmentación verde oscuro y aumentó a 7 días y aún más a 2 meses de crecimiento, debido a la producción de melanina (Chi et al. 2009; Li et al. 2009), por lo que se decidió utilizar un inóculo de 24 h de crecimiento (Figura 10a) para realizar los siguientes experimentos que implican las cinéticas a nivel matraz y fermentador.

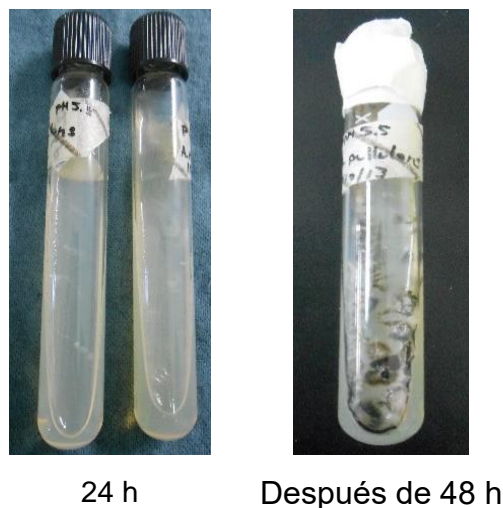


Figura 9. Conservación de de *A. pullulans* en tubos inclinados con PDA.

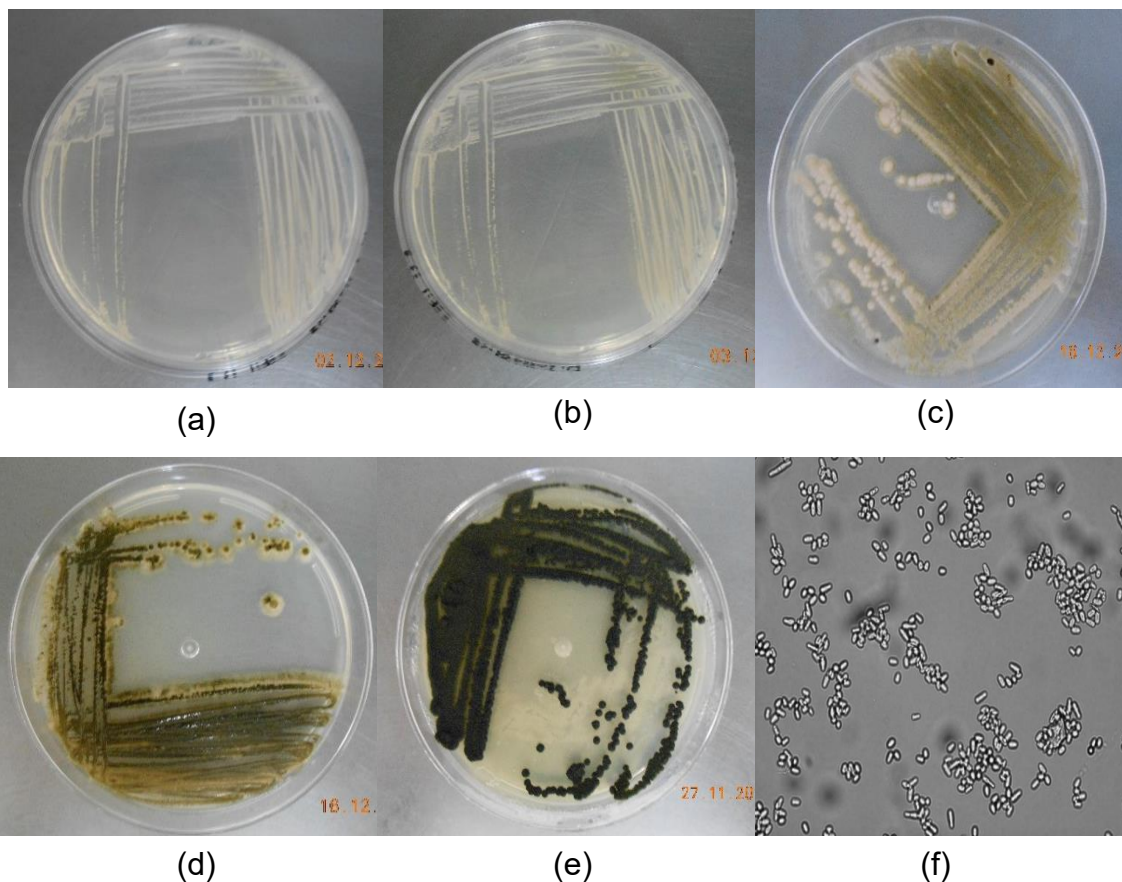


Figura 10. Propagación de *A. pullulans* en medio PDA pH5.5 a diferentes tiempos: 24 h (a), 48h (b), 72h (c), 7 días (d), y 2 meses(e). Morfología típica de la levadura (f).

3.2 Aislamiento de almidón a partir de cebada

Para la extracción de almidón a partir de granos de cebada se realizó un proceso de molienda húmeda combinando dos métodos previamente reportados (Wang y Wang, 2004; Quintos et al. 2009).

La cebada utilizada fue obtenida de la ciudad de Pachuca, Hidalgo por medio de productores locales, fue tamizada empleando una malla No. 8 y 10 US (2.36 y 2.00 μm respectivamente) para retirar todas las impurezas de mayor tamaño tales como piedras, insectos, otros granos, etc. Las impurezas que no se pudieron separar a través de tamizado se quitaron manualmente.



Posteriormente se realizó un proceso de perlado, el cual consistió en hacer pasar el grano de cebada a través de un sistema que ejerza presión sobre éste para separar la cascarilla que lo protege. Se utilizó una licuadora industrial para moler el grano por 50 segundos para retirar la cascarilla y obtener un grano de cebada integro, el producto obtenido se pasó por un tamiz No. 8 US para eliminar la cascarilla, la que no se logró quitar con el tamiz se realizó manualmente.

Posteriormente se molió en seco la cebada utilizando un molino para granos y especias, ajustando la apertura de los discos del para obtener un polvo ligeramente granuloso. En la figura 11 se muestran las fotos del proceso de perlado y molienda para obtener harina.

A partir de la harina de cebada se inició la extracción de almidón presente en el grano. La harina se sometió a un proceso de macerado con NaOH al 0.1% a una relación de 1:2 (m/v) por un periodo de 18 h a una temperatura de 4 °C, la mezcla obtenida se hizo pasar por un tamiz No. 100 y 200 US lavando dos veces con agua destilada. Realizando dos veces el proceso de molienda-lavado.

La suspensión obtenida a partir de los lavados se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4 °C, se pudo apreciar la formación de dos fases, la inferior de color blanco, correspondiente al almidón, y la superior de color café debida al contenido de proteínas, fibra y pigmentos. Éstas dos fases se forman debido a la diferencia de densidades de gluten hidratado (1.1 g/ml) en comparación con el almidón (1.5 g/ml) facilitando su separación al formar una pastilla (Vasanthan y Hoover, 2009). Las fases se separaron cuidadosamente con una espátula.

El almidón obtenido se resuspendió con agua destilada ajustando el pH a 6.5 con HCl y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente. Se separa nuevamente las dos fases y se descarta el sobrenadante el almidón se secó a 30°C por 24 en un horno. En las figuras 11 y 12 se presentan las imágenes del proceso.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

Figura 11. Proceso de limpieza y obtención de harina: cebada con impurezas (a), cebada libre de impurezas (b). Perlado del grano de cebada: Licuadora utilizada para retirar la cascarilla (c), separación del grano y cascarilla (d), grano de cebada limpio (e), molienda (f) y harina (g).



(a)



(b)



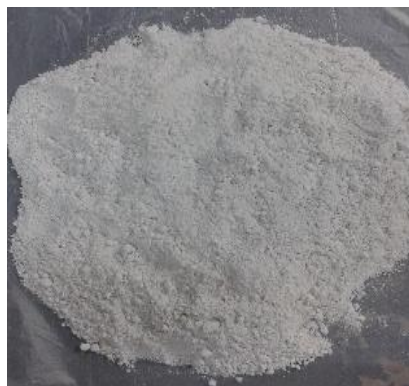
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 12. Proceso de extracción de almidón a partir de cebada, incluye: maceración (a), molienda húmeda (b), suspensión de almidón (c), centrifugación (d), separación de fases en pigmentos (e) y almidón (f).



Los rendimientos de la etapa de limpieza y de extracción del almidón se presentan en las tablas 11 y 12, respectivamente. El rendimiento de 29 % de almidón del presente estudio es comparable al reportado por Quintos et al. (2009), quienes obtuvieron rendimientos de 35.91% y 30.23 % de la cebada variedad Esmeralda Apan perlada y sin perlar respectivamente; y de la variedad Esmeralda Almoloya 33.8 % perlada y 28.4 % sin perlar. Por otro lado, se considera moderado con respecto a Prieto et al. (2009) que reportaron 60% de rendimiento con cebada de buena calidad, empleando cloruro de mercurio para favorecer la separación. Estos resultados indican que al tratarse de cebada de baja calidad podría ser materia prima potencial para obtener otros productos de interés.

Tabla 11. Rendimientos en la etapa de limpieza de cebada maltera.

Peso inicial (kg)	Peso grano (kg)	Rendimiento (%)	Peso grano (kg)	Peso harina (kg)	Rendimiento (%)	Rendimiento total (%)
2.5	2.08	83.2	2.080	2.065	99	84

Tabla 12. Rendimientos en la fase de extracción de almidón a partir de cebada maltera.

Peso harina (kg)	Peso almidón (kg)	Peso pigmentos (kg)	Rendimiento de almidón (%)
2.08	0.6	0.598	29

3.3 Actividad de las enzimas producidas por *A. pullulans*

En la figura 13, se observa el crecimiento en placa de *A. pullulans* incubado a 30°C, durante 48 h, en un medio basado en almidón de cebada, soluble y maíz, se observó que en almidón de maíz se tuvo un ligero crecimiento, mientras que el almidón soluble fue mayor y para almidón de cebada se obtuvo un crecimiento mucho más abundante, así como halos de hidrólisis lo que indica que *A. pullulans* produce amilasa que hidrolizan almidón de diferentes fuentes.

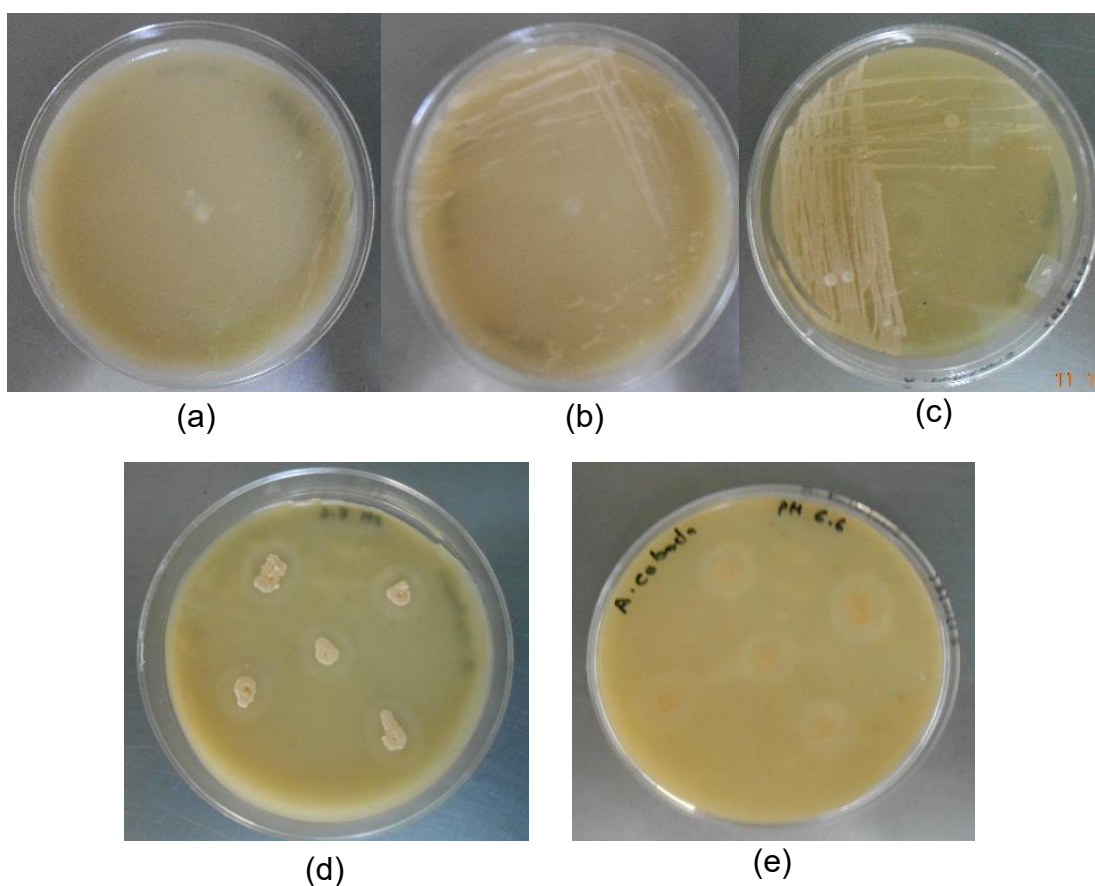


Figura 13. Crecimiento de *A. pullulans* a 48 h en medio a base de almidón a pH 5.5 y una relación carbono nitrógeno, C:N de 8 (a) almidón de maíz, (b) Almidón soluble, (c) Almidón de cebada. Halos de hidrólisis de enzimas amilolíticas de *A. pullulans* en almidón de cebada (d) y (e).



3.4 Cinética de crecimiento de *A. pullulans* en cultivo a nivel matraz.

En la gráfica de la figura 14 se presenta la curva de crecimiento de *A. pullulans* durante 54 h en medio líquido basado en almidón de cebada; se observó una correlación entre el crecimiento y la liberación de glucosa, demostrando la actividad amilolítica de *A. pullulans*. Se observó un mayor crecimiento a las 24 h con 1.98×10^6 células/ml, así como la concentración más elevada de glucosa, siendo de 2.58 g/l.

En cuanto a la actividad enzimática, en la misma figura se puede observar que a las 24 h se presentó mayor actividad de glucoamilasa con 49.7 U/ml, correspondiendo con la mayor concentración de glucosa. En la figura 15, se presenta la actividad enzimática de α -amilasa; mostró mayor actividad a las 36 h con 2.1 U/ml, mientras que β -glucosidasa también presentó una mayor actividad con 1.93 U/ml. La actividad enzimática fue asociada al crecimiento.

Con respecto a la concentración de carbohidratos totales, en la figura 16 se observa su consumo desde el inicio de la fermentación debido a que el almidón es la principal fuente de carbono, la variación que se presentó entre las 12 y 30 h se debe a que existen fracciones de amilopectina que no han sido hidrolizadas y la levadura continúa en la etapa de crecimiento. De igual manera a las 24 h se obtuvo la mayor de producción azúcares reductores, cabe mencionar que se incluyen glucosa y posiblemente oligosacáridos producidos durante la hidrólisis del almidón.

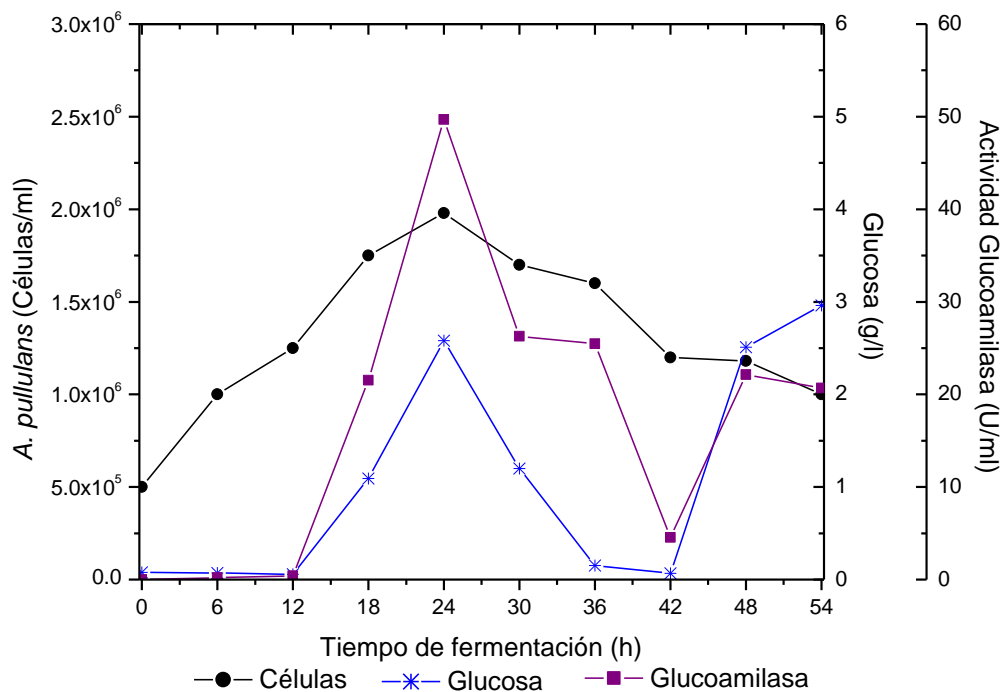


Figura 14. Curva de crecimiento de *A. pullulans* en medio líquido basado en almidón de cebada a nivel matraz, actividad glucoamilasa y liberación de glucosa.

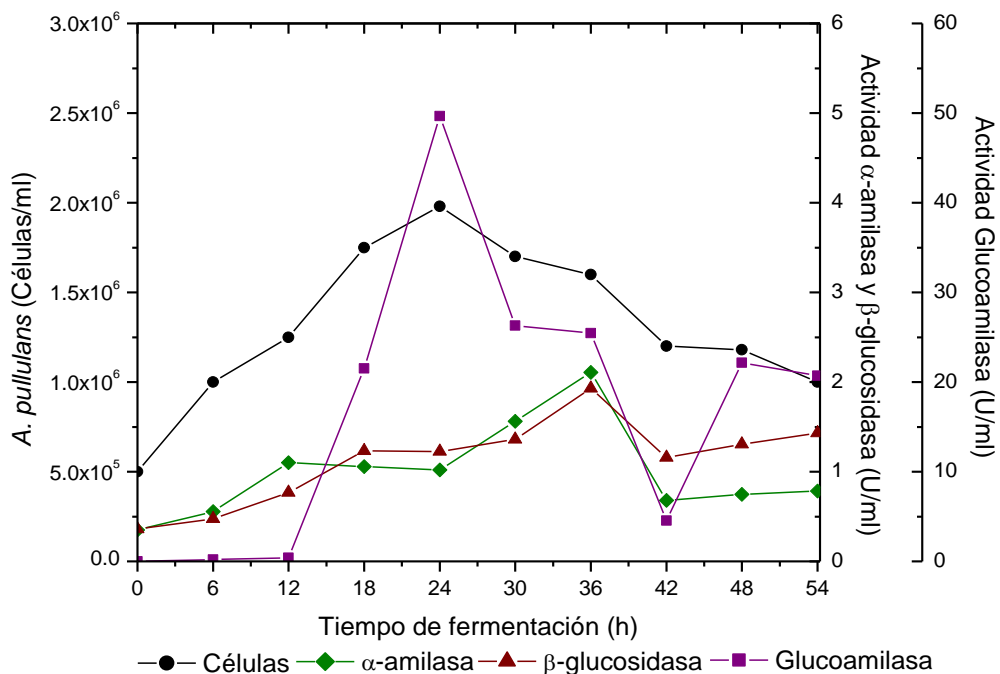


Figura 15. Actividad enzimática de *A. pullulans* durante la fermentación a nivel matraz.

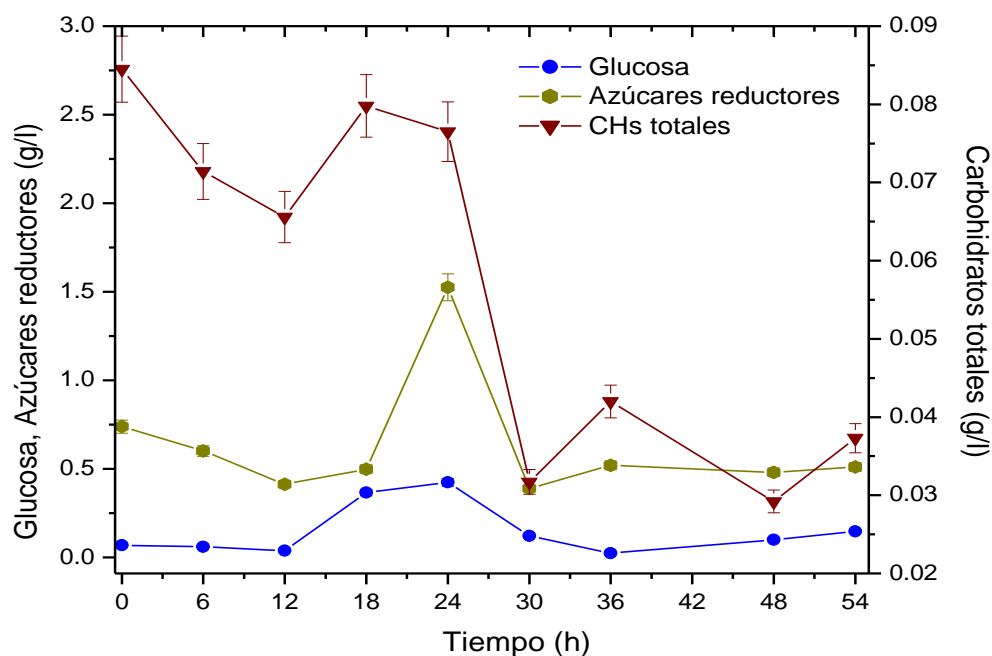


Figura 16. Producción de glucosa, azúcares reductores y carbohidratos totales por *A. pullulans* en cultivo a nivel matraz.

3.5 Cinética crecimiento de *A. pullulans* en cultivo a nivel fermentador

Se desarrollaron cinéticas de crecimiento a nivel fermentador en medio basado en almidón de cebada con relación C:N de 8 y los componentes indicados en la tabla 10. En la tabla 13, se presenta un resumen con los resultados más representativos. Se observó que el crecimiento celular tuvo el mismo orden de magnitud para las diferentes fermentaciones, se presentó una variación con respecto a la actividad de las cuatro enzimas. Sin embargo, se observó el mismo perfil de producción. Para glucoamilasa se obtuvo una mayor actividad entre las 12 a las 21 h. Con respecto a la actividad α -amilasa de las 21 a las 30 h, para α -glucosidasa de las 24 a las 30 h, al igual que para β -glucosidasa.

Tabla 13. Resultados de diferentes fermentaciones con *A. pullulans* en medio basado en almidón de cebada.

Actividad enzimática máxima					
Fermentación	Células/ml	Glucoamilasa	α -amilasa	α -glucosidasa	β -glucosidasa
F1	6.5×10^8 , 27 h	318.2 (U/ml), 18 h	7 (U/ml), 21 h	--	7.6 (U/ml), 30 h
F2	1.39×10^7 , 30 h	145 (U/ml), 21 h	4.7 (U/ml), 33 h	4.8 (U/ml), 30 h	6.6 (U/ml), 30 h
F3	3.6×10^8 24 h	291 (U/ml), 12 h	7.8 (U/ml), 21 h	4.54 (U/ml), 24 h	7.7 (U/ml), 24 h
F4	3.85×10^8 27 h	176 (U/ml), 18 h	2.9 (U/ml), 27 h	5.1 (U/ml), 27 h	7 (U/ml), 27 h
F5	5.6×10^8 30 h	193 (U/ml), 15 h	7.4 (U/ml), 30 h	8.1 (U/ml), Promedio de 24 h a 30 h	8.5 (U/ml), 24 h

En la figura 17 se presenta la cinética de crecimiento de *A. pullulans*, la actividad glucoamilasa y la liberación de glucosa, es posible observar que el mayor crecimiento fue a las 30 h, con 5.6×10^8 células/ml, una actividad de 193 U/ml, correlacionándose con la liberación de glucosa a partir de almidón, que alcanzó una concentración máxima de 14.6 g/l a las 18 h, Li et al. (2007a) evaluaron *A. pullulans* N-13d con almidón soluble (10 g/l) y reportaron una actividad máxima de 10 U/ml a las 32 h. Goyal et al. (2005) reportan con *Bacillus* sp. I-3 actividades de glucoamilasa de 90 U/ml y 181 U/ml usando almidón soluble y almidón de maíz respectivamente, mientras que con amilosa y amilopectina determinaron 0.34 U/ml y 0.47 U/ml respectivamente. La glucoamilasa es la primera en inducirse, debido a que, al inicio de la fermentación el almidón es la única fuente de carbono, la produce debido a que hidroliza el polisacárido actuando sobre los enlaces glicosídicos α -1,4 y α -1,6. Es por esto que las glucoamilasas son usadas principalmente en la producción de jarabes de glucosa, jarabes de alta fructuosa, en la producción de ácido láctico, así como en la hidrólisis de almidón para la producción de bioetanol (Wang et al. 2008).

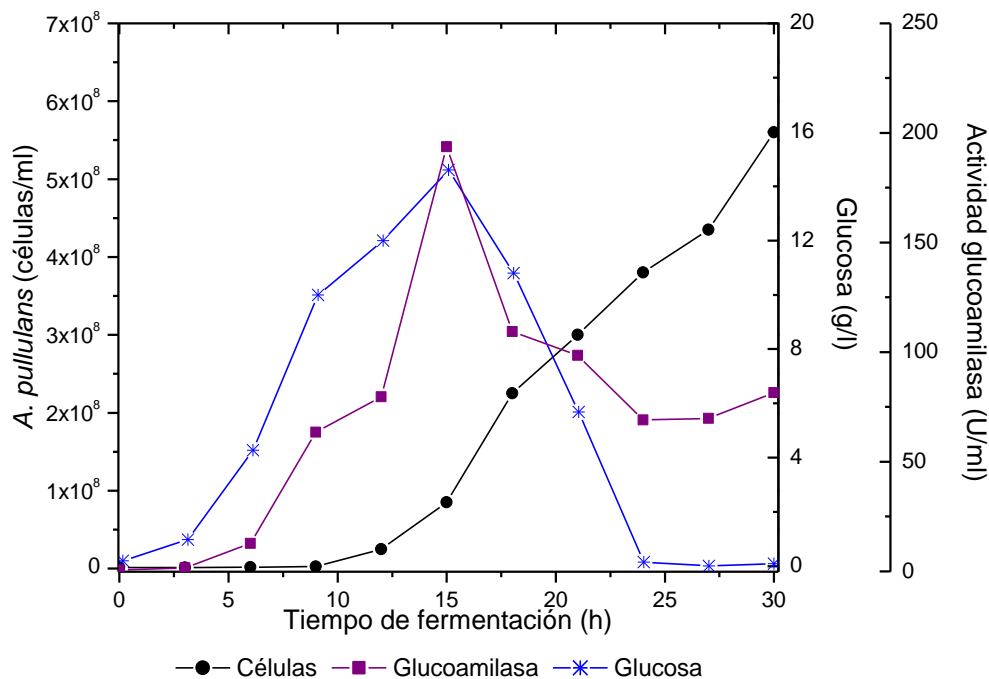


Figura 17. Crecimiento celular de *A. pullulans*, actividad glucoamilasa y liberación de glucosa en cultivo a nivel fermentador.

En cuanto a la producción de glucosidasas, la figura 18 muestra que la producción de α -glucosidasa coincide con el crecimiento de *A. pullulans*, La máxima producción fue de las 24 h a las 30 h (valor promedio de 8.1 U/ml) que coincide con la fase estacionaria. Hasta la fecha solo el trabajo de Saha et al. (1993) reportaron la producción de una α -glucosidasa por *A. pullulans* NRRL Y12974, obtuvo actividades de 2.14 U/ml, 0.77 U/ml y 1.59 U/ml en almidón, amilosa y amilopectina respectivamente, todos a una concentración de 10 g/l.

Con respecto a la producción y actividad de α -amilasa, en la misma figura se muestra un perfil similar a las glucosidasas, donde a las 30 h presentó su mayor actividad con 7.4 U/ml. Solo Saha y Bothast (1993) reportaron obtener una producción de α -amilasa por *A. pullulans* NRRL Y12794 con 0.47 U/ml de actividad en fermentación en sustrato sólido y durante 4 días de proceso.

La producción de β -glucosidasa coincidió con el crecimiento y mostró su actividad máxima a las 24 h con 8.5 U/ml (figura 18). Este valor obtenido es mayor con respecto a lo reportado por Saha et al. (1993), al evaluar *A. pullulans* NRRL Y12974 con salvado de maíz como sustrato a 10 g/l, obtuvieron una actividad de 0.27 U/ml. Mientras que Ribeiro et al. (2007b) evaluaron *A. pullulans* ER-16 usando salvado de trigo a 10 g/l, obtuvieron una actividad de 1.0 U/ml.

Por lo que la producción de enzimas amilolíticas por *A. pullulans* ATCC15233 al usar almidón de cebada de baja calidad como sustrato es adecuada, debido a que la actividad de las enzimas fue superior a las que se han reportado hasta el momento para dicha levadura. Esto sugiere que el almidón de cebada de baja calidad puede ser utilizado como sustrato potencial para la producción de productos de valor agregado como las enzimas. En la tabla 14 se realiza una comparación de la producción de amilasas por diferentes cepas de *A. pullulans*, incluyendo actividades máximas, sustratos utilizados y condiciones de fermentación.

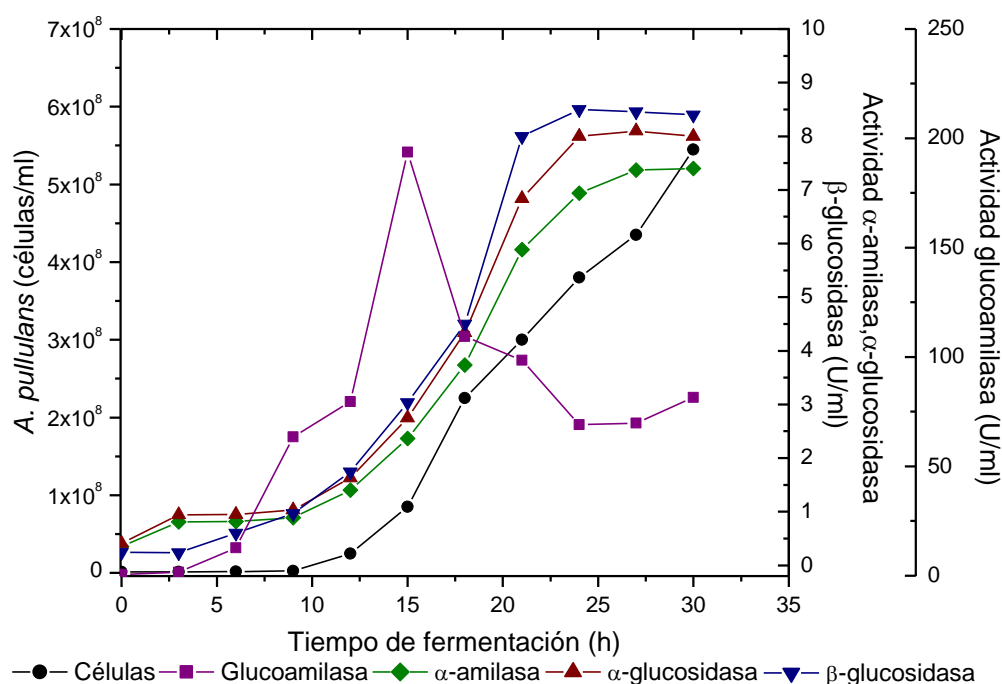


Figura 18. Crecimiento celular de *A. pullulans*, actividad de glucoamilasa, α -amilasa y β -glucosidasa en cultivos a nivel fermentador.



Tabla 14. Producción de amilasas por diferentes cepas de *A. pullulans* comparadas con la obtenidas en este trabajo.

Enzima	Cepa	Actividad	Sustrato	Condiciones de cultivo	Referencia
Glucoamilasa	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-12974	42.19 U/mg (purificada)	Almidón soluble (1% m/v)	FL, 28°C, 200 rpm, 4 d	Saha et al. 1993
	<i>Aureobasidium pullulans</i> N13d	10 U/ml	Almidón soluble (1% m/v)	FL, pH 4.0, 28°C, 180 rpm, 56 h	Li et al. 2007
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC15233	193 U/ml	Almidón de cebada (5%)	FL, pH 5.5, 30°C, 600 rpm, 30 h	Este trabajo
α -amilasa	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-12974	17.33 U/mg (purificada)	Almidón soluble (1% m/v)	FL, 28°C, 200 rpm, 4 d	Saha et al. 1993
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC15233	7.4 U/ml	Almidón de cebada (5%)	FL, pH 5.5, 30°C, 600 rpm, 30 h	Este trabajo
α -glucosidasa	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-12974	3.17 U/ml	Maltosa (1% m/v)	FL, 28°C, 200 rpm, 4 d	Saha et al. 1993
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC15233	8.1 U/ml	Almidón de cebada (5%)	FL, pH 5.5, 30°C, 600 rpm, 30 h	Este trabajo
β -glucosidasa	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-12974	0.23 U/ml	Salvado de maíz (1% m/v)	FL, pH 5.0, 28°C, 200 rpm, 96 h	Saha et al. 1994
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ER-16	1.7 U/ml (purificada)	Salvado de maíz (10 g)	FS, pH 6.0, 28°C, 75% de humedad, 120 h	Leite et al. 2007
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ER-16	1.3 U/ml	Salvado de trigo (5 g)	FS, 28°C, 75% de humedad, 120 h	Leite et al. 2008
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC15233	8.5 U/ml	Almidón de cebada (5%)	FL, pH 5.5, 30°C, 600 rpm, 30 h	Este trabajo

FL: Fermentación líquida
FS: Fermentación sólida

3.6 Actividad enzimática del extracto enzimático

De acuerdo a los resultados de la tabla 13 y al perfil de actividad enzimática mostrado en la figura 18, se determinó establecer 30 h de fermentación como el tiempo adecuado para realizar la recuperación del cultivo e iniciar el proceso de separación y purificación de las enzimas amilolíticas. Se preparó una solución de 5 ml del extracto crudo; se cuantificó proteína y actividad enzimática usando sustratos específicos, los resultados se presentan en la tabla 15. En la figura 19 se presenta el zimograma con almidón coopolimerizado; se observan tres bandas de hidrólisis asociadas a las amilasas presentes en el extracto crudo.

Tabla 15. Actividad enzimática del extracto crudo.

Actividad enzimática (U/ml)	
Glucoamilasa	440.94 U/ml
α -amilasa	19.36 U/ml
α -glucosidasa	20.02 U/ml
β -glucosidasa	19.40 U/ml
Proteína	7.6 mg/ml

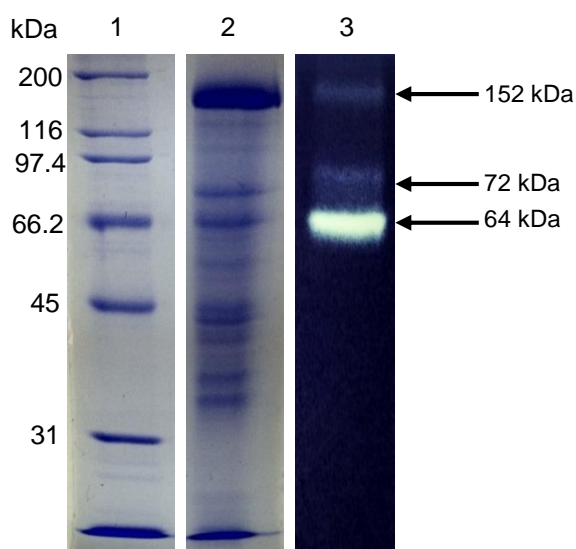


Figura 19. Análisis electroforético (SDS-PAGE al 10 %). 1: Marcadores de peso molecular, 2: Extracto crudo (teñido con coomassie), 3: Zimograma (Extracto crudo).

3.7 Purificación parcial de enzimas amilolítica producidas por *A. pullulans*

La separación y purificación parcial se realizó por cromatografía de intercambio iónico. En la figura 20 se presenta el perfil cromatográfico, donde se pueden observar la absorbancia medida a 280 nm, a todas las fracciones colectadas y el gradiente de KCl. Existen dos regiones importantes; una que comprende de la fracción 1 a la 60 y otra desde la fracción 70 hasta la 120; la primera región se atribuye a la presencia de proteínas que no interaccionaron con la resina (cargada positivamente) por lo cual eluyeron rápidamente, en la segunda región las proteínas presentes si fueron retenidas por la resina, necesitando aplicar un gradiente de concentración de KCl desde 0.02 a 0.5 M para poder resuperarlas. A éstas fracciones se les determinó la actividad enzimática para glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa. En la figura 21 se observa que la actividad enzimática aún coincide en algunas fracciones: Glucoamilasa de la fracción 68 a la 95 (21a), α -amilasa de la fracción 76 a la 94 (21b), α -glucosidasa de la fracción 76 a la 100 (21c) y β -glucosidasa de la fracción 70 a la 120 (21d).

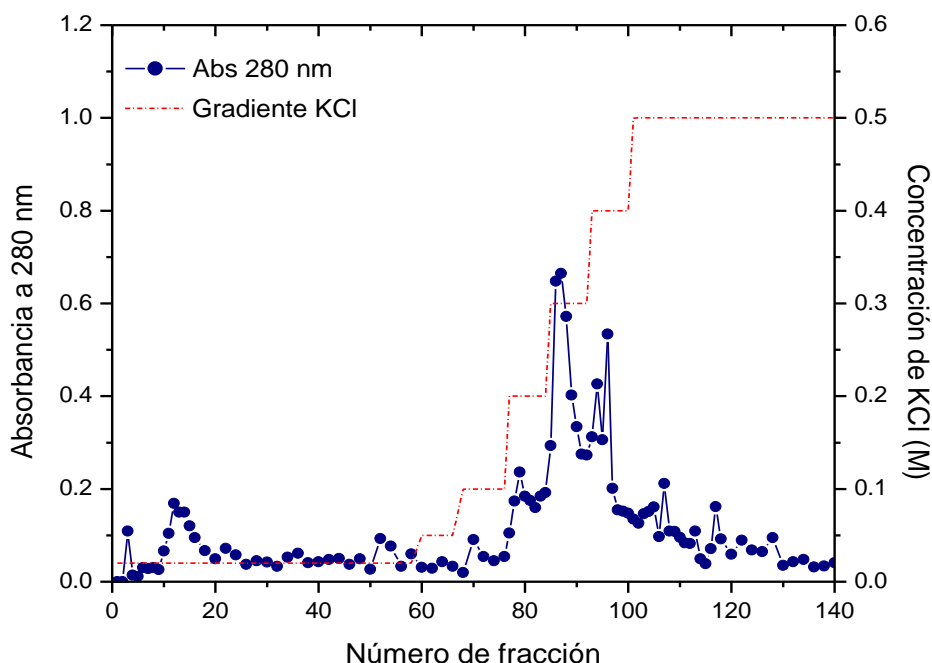


Figura 20. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico (Unosphere Q), del extracto crudo usando buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5.

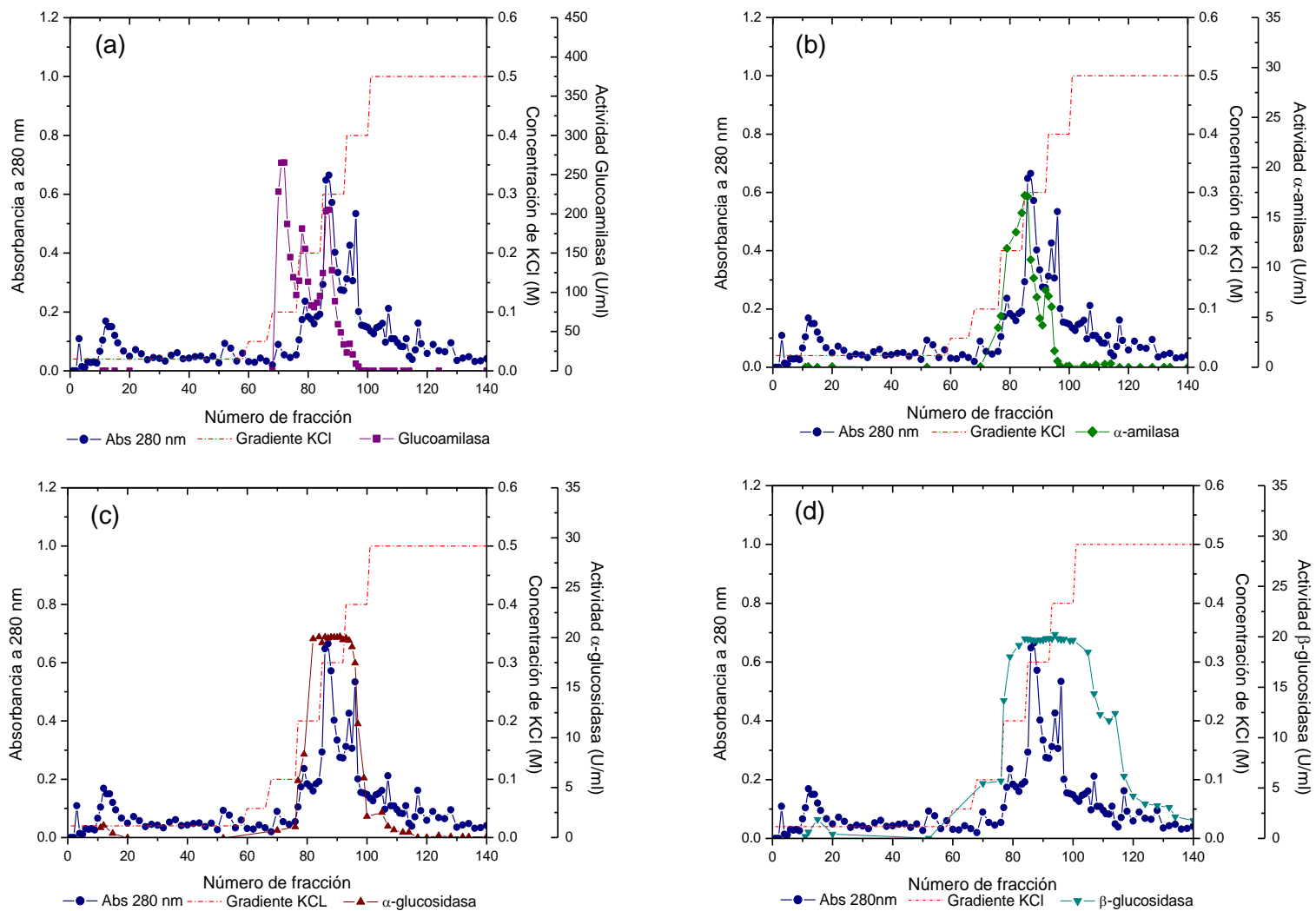


Figura 21. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico usando buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. Gradiente de KCl, actividad enzimática: glucoamilasa (a), α-amilasa (b), α-glucosidasa (c) y β-glucosidasa (d).

Para corroborar los resultados se realizó el análisis electroforético, se prepararon geles de poliacrilamida para cargar todas las fracciones con actividad enzimática, las que presentaron un perfil protéico similar se mezclaron (P1: 70-73, P2: 74-77, P3: 78-80, P4: 81-85, P5: 86-89, P6: 90-93, P7: 94-101 y P8: 102-120) como se muestra en la figura 22. Se eligieron las fracciones de la 81 a la 85 (P4) para realizar la siguiente etapa de purificación debido a que se observaron menos bandas asociadas a proteínas. Posteriormente, se utilizó cromatografía de intercambio catiónico, en la figura 23 se presenta el perfil cromatográfico, el gradiente de concentración de KCl y la actividad enzimática se observa que aún coincide en algunas fracciones: Glucoamilasa de la fracción 10 a la 28 (23a), α -amilasa de la fracción 16 a la 24 (23b), α -glucosidasa de la fracción 12 a la 26 (23c) y β -glucosidasa de la fracción 12 a la 28 (23d).

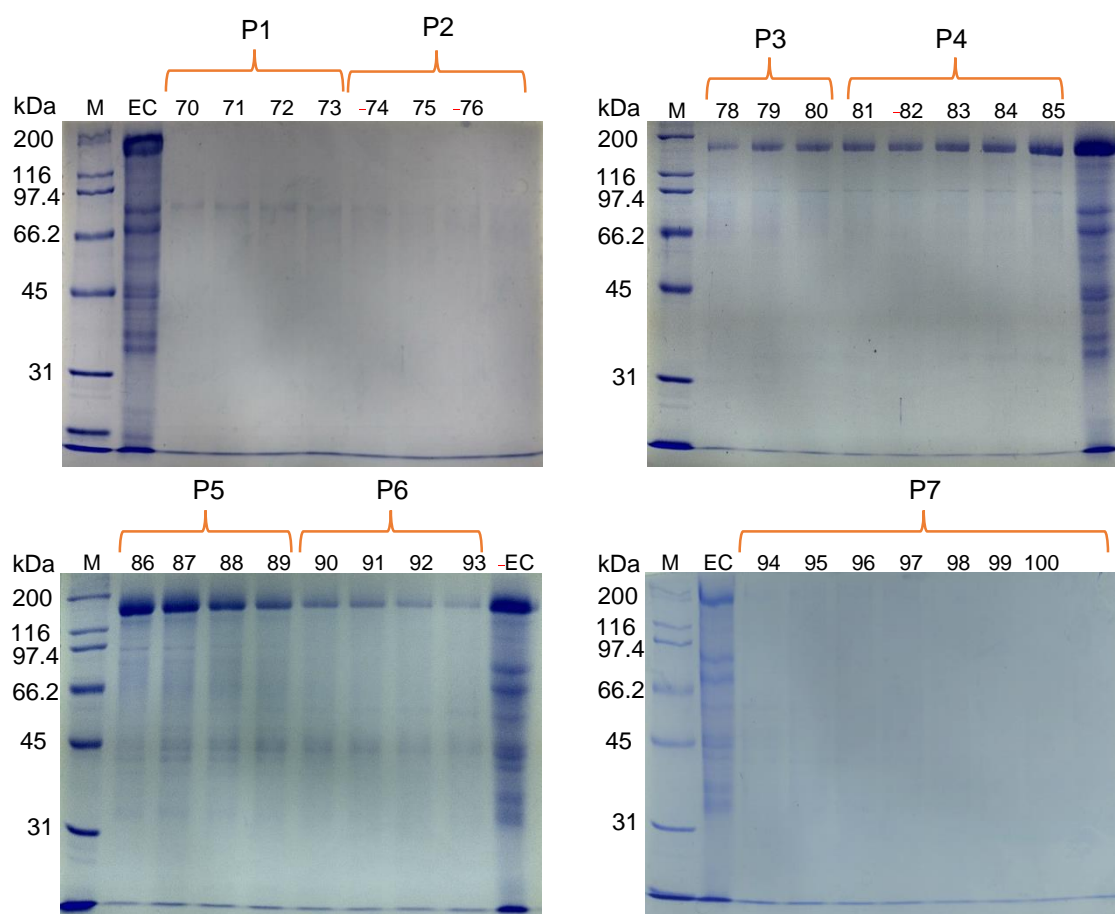


Figura 22. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo.

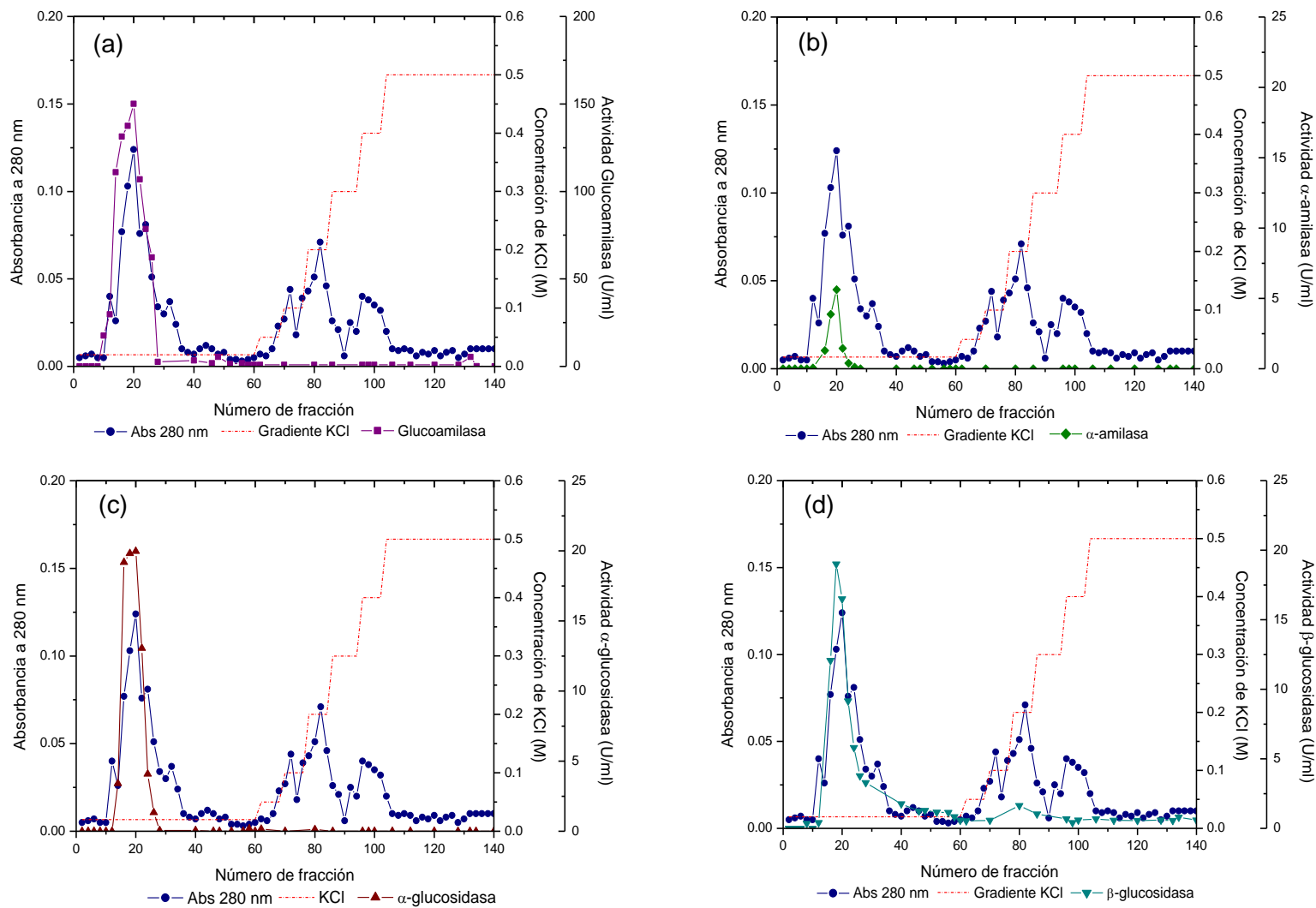


Figura 23. Perfil cromatográfico defiltración en gel, usando buffer de acetato 50 mM, pH 5.0. Actividad enzimática: glucoamilasa (a), α -amilasa (b), α -glucosidasa (c) y β -glucosidasa (d).

Se prepararon geles de poliacrilamida para cargar todas las fracciones con actividad enzimática. De acuerdo al perfil protéico observado en la figura 24, se mezclaron (P1: 10-14, P2: 15-22, P3: 23-25, P4: 26-86, P5: 88-106). No se presentan los geles de P4 y P5, debido a que las bandas presentes resultaron poco intensas y en la fotografía no se observaron.

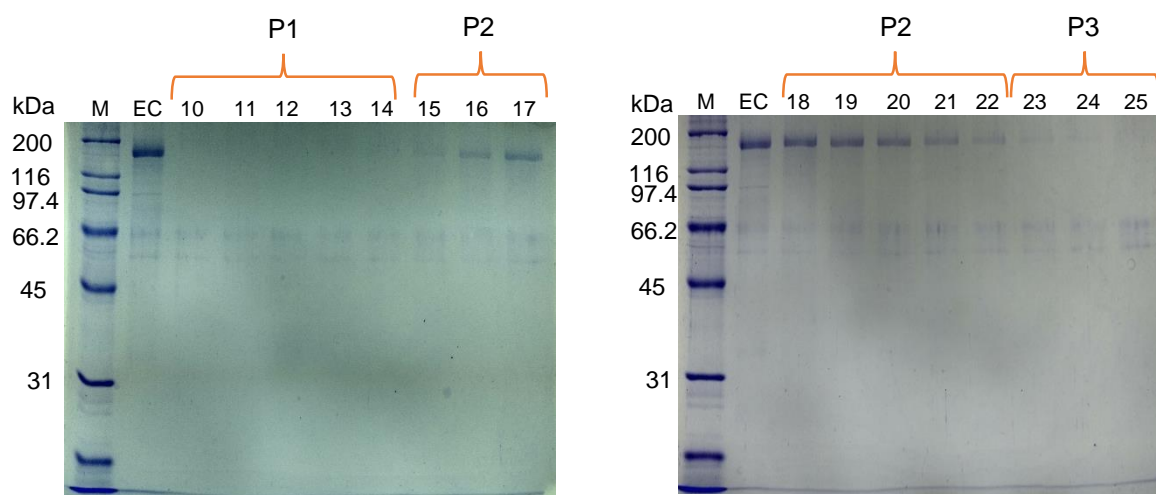


Figura 24. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo.

Se eligieron las fracciones de la 15 a la 22 (P2) para realizar la siguiente etapa de purificación debido a que se observaron menos bandas asociadas a proteínas. En la figura 25 se presenta el perfil cromatográfico de filtración en gel y la actividad enzimática, se observa que se logró separar parcialmente las enzimas en algunas fracciones: Glucoamilasa de la fracción 16 a la 26 (25a), α -amilasa de la fracción 16 a la 24 (25b), α -glucosidasa de la fracción 4 a la 12 (25c) y β -glucosidasa de la fracción a la 12 (25d). Para corroborar los resultados las fracciones fueron analizadas por electroforesis, se prepararon geles de poliacrilamida y se cargaron las que tuvieron actividad enzimática, las que presentaron un perfil protéico similar se mezclaron (P1: 7-14, P2: 17-24) como se muestra en la figura 26.

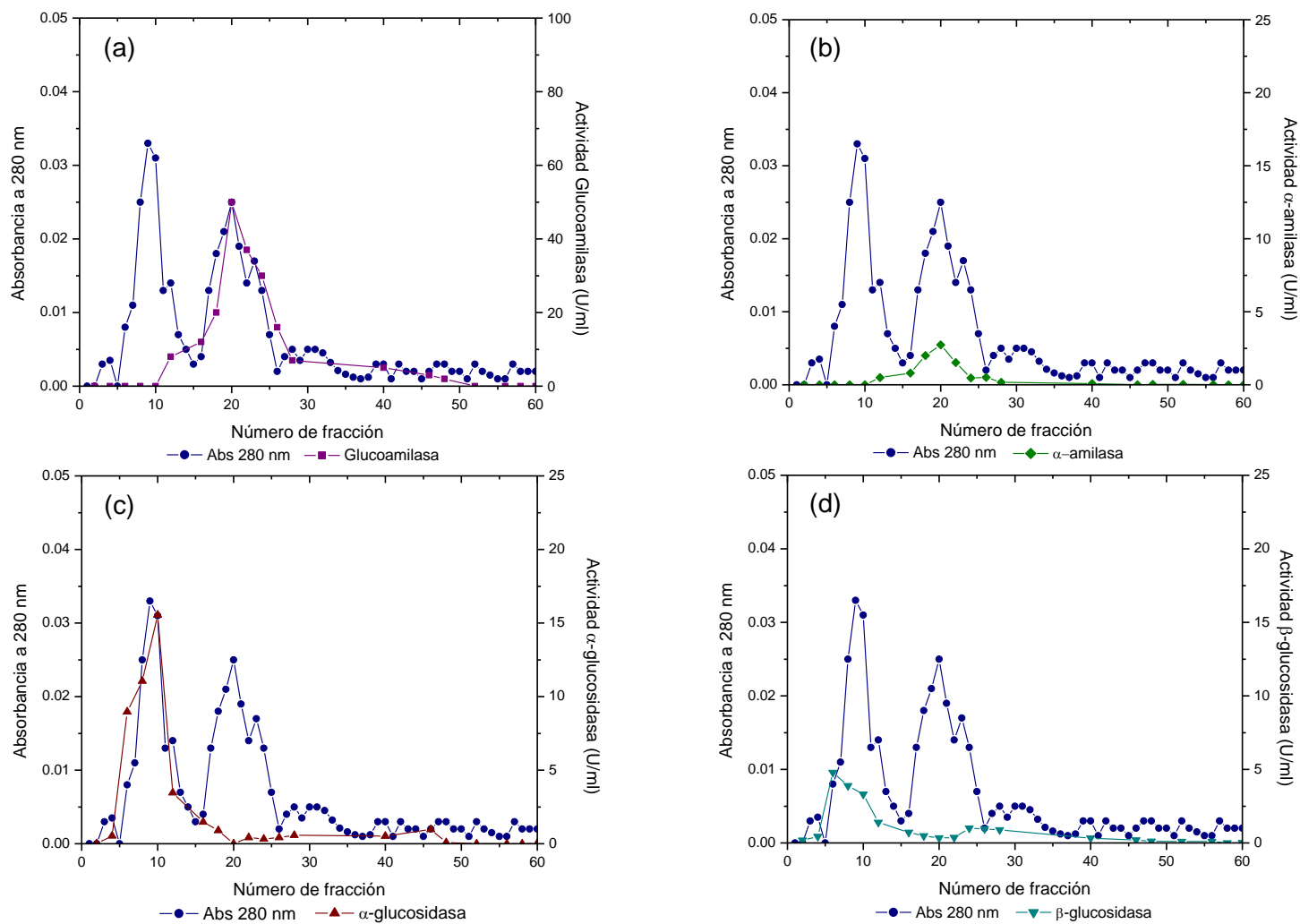


Figura 25. Perfil cromatográfico defiltración en gel, usando buffer de acetato 50 mM, pH 5.0. Actividad enzimática: glucoamilasa (a), α -amilasa (b), α -glucosidasa (c) y β -glucosidasa (d).

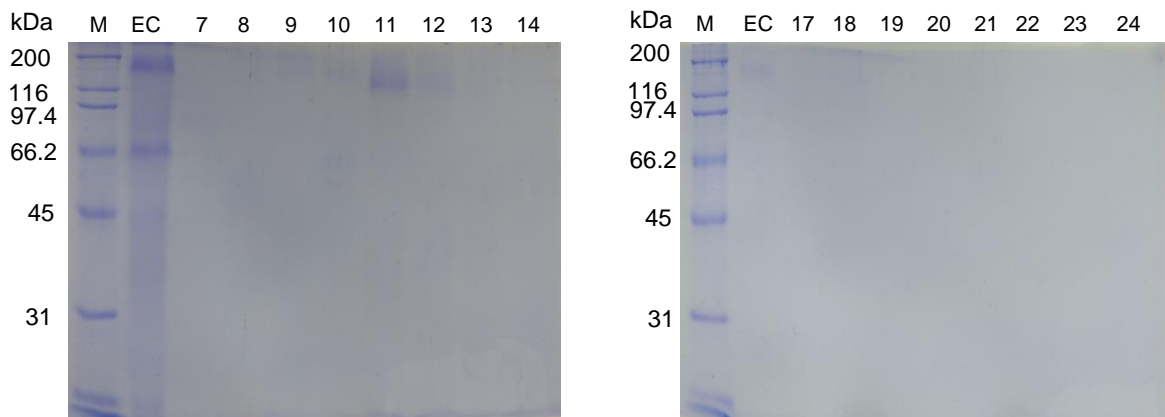


Figura 26. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel, M: marcadores de peso molecular, EC: extracto enzimático crudo.

En la figura 27 se hace un resumen de la purificación parcial de las enzimas glucoamilasa y α -glucosidasa de 152 kDa y 72 kDa respectivamente, incluyendo las tres técnicas cromatográficas utilizadas (intercambio aniónico, catiónico y filtración en gel).

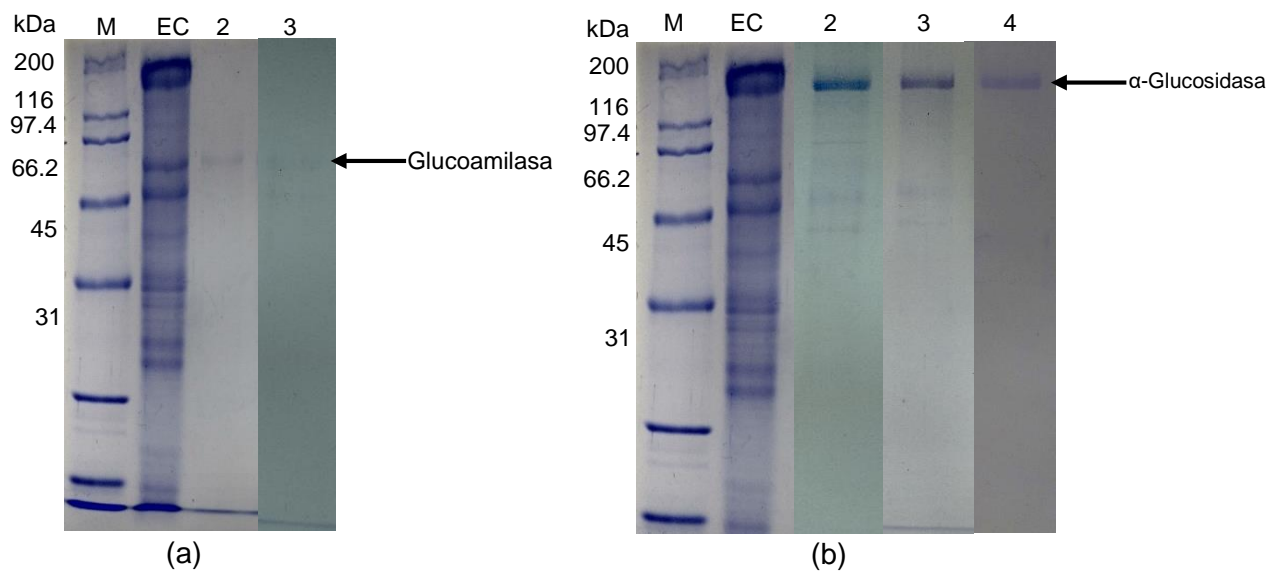


Figura 27. Análisis electroforético (SDS-PAGE al 10%) de la purificación de glucoamilasa (a) y α -glucosidasa (b). M: marcadores de peso molecular, EC: Extracto enzimático crudo, 2: C. intercambio iónico, 3: C. intercambio catiónico, 4: C. Filtración en gel.



3.8 Identificación de proteínas

Se detectaron tres proteínas con actividad amilolítica (152 kDa, 72 kDa, y 64 kDa, por zimograma: figura 19) las cuales se enviaron a identificar y con los resultados obtenidos se analizaron y se realizaron alineamientos con secuencias reportadas para enzimas amilolíticas de *A. pullulans*.

La primera proteína en analizarse fue la de 152 kDa, la cual presentó una homología mayor al 95 % con una glicosil hidrolasa de la familia GH31, proveniente de *Aureobasidium melanogenum* CBS 110374 con número de acceso A0A074VNI7. Se realizó la búsqueda en **Carbohydrate-Active enZymes Database** (<http://www.cazy.org/>) y se determinó que dentro de la familia GH31 se encuentran clasificadas enzimas en conformación α como: α -glucosidasa, α -galactosidasa, α -manosidasa, α -xilosidasa, α -glucan liasa, entre otras. Las cuales actúan por mecanismos de retención y tienen una estructura terciaria de barril $(\beta/\alpha)_8$, por lo que se sugirió que se trataba de una α -glucosidasa.

Utilizando los tres péptidos: **NLYGTHPF**, **TLGGTIDLYFFDGPTPAEVTK** y **DFENDPNTFPYDQGK**, se realizó un alineamiento múltiple en **UniprotKB** (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) con α -glucosidasas de cuatro variedades de *Aureobasidium*; *pullulans*, *melanogenum*, *namibiae* y *subglaciale*, se observa en la figura 28; los números de acceso se indican entre paréntesis. Los residuos de aminoácidos en azul cian indican que son conservados, mientras que los amarillos representan cambios.



CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

A. melanogenum CBS 110374 -----MMFPQFKRAALFALPAVAASQTTSS-D----- 27
A. namibiae CBS147.97 -----MIFPSFKRATLFALPAAAAISQSTTQ-SASTES 32
A. pullulans EXF-150 MFLSLKSPDQQVLVILLCLLEAIDSMIFPFSKRVALFVLPVSATISEPVTT-TWSKGR 59
A. subglaciale EXF-2481 -----MMFPSFKRPALFALSASTAVMAQMTTSDSPNN 33
A. pullulans MFPSFLAHDSPVPTITFLLLEETIDNMMFPSFKRPALFALSASTAVMAQMTTSGFSPTN 60
      *:* * * :*: * . : : :

A. melanogenum CBS 110374 TVLVYEDQFIEFVSALPQNYNLYGLGERLHGIRLGDNLATMYAADNGNPIDRNLVYGTHP 264
A. namibiae CBS147.97 TVLVFEDQFVEFVSELPENYNLYGLGERLHGIRLGDNLATMFAADNGNPIDLNLVYGTHP 272
A. pullulans EXF-150 TVLVYENQFIEFVSALPENYNLYGLGERLHNIRLGNLNTATIFATDDGDPLDVGLYGSHP 299
A. subglaciale EXF-2481 TVLVYEDQFIEFVSALPENYNLYGMGENLHGIRLGDNYTTTFYAADNGNPIDRNLVGVHP 273
A. pullulans TVLVYEDQFIEFVSALPENYNLYGMGENLHGIRLGDNYTTTFYAADNGNPIDRNLVGVHP 300
      ***:*:*:*: * *:*****:*. * .***:* * *: :*:*:*: * * .*** **

A. melanogenum CBS 110374 FYLDTRYEYKDSMTGNLTLTGNAS--ANASYISYSHGVYLRNSHGQEPILNAGNITWRT 322
A. namibiae CBS147.97 FYLDTRYEYKDPETSALTLLTGNAS--ANASYISYSHGVYLRNAHGQEPILNAGNITWRT 330
A. pullulans EXF-150 FYLDTRYEYQDPETSALTLLTGNAS--DDANYISYSHGVYLRNSHGMEPILNARNITWRT 357
A. subglaciale EXF-2481 MYVDTRYEYKDPVNGTSLTLLTGDTDTDNASYISYSHGVYLRNAHGMEALMQNGNITWRA 333
A. pullulans MYVDTRYEYKDPVNGTSLTLLTGDTD--TNASYISYSHGVYLRNAHGMEALMQNGNITWRA 358
      :*:*****: * .. *:*****: . :*.*****: * * : : : *****:

A. melanogenum CBS 110374 LGGTIDLYFFDGPTPAEVTKQYQTAIGLPAQQYWTFGYHQCRWGYNWMMQDQVVDNF 382
A. namibiae CBS147.97 LGGNIDLYFFDGNQAEVTKQYQNGAIGLPAQQYWTFGYHQCRWGYNWMMQDQVVDNF 390
A. pullulans EXF-150 LGGNIDLYFFDGPTQVEVTKQYHNGAIGMPAMQQYWTFGYHQCRWGYNWMMQEVIDTF 417
A. subglaciale EXF-2481 LGGSIDLYFFDGPTQAEVTKQYQLGAVGLPAMQQYWAFGYHQCRWGYNWMMQDQVVDNF 393
A. pullulans LGGSIDLYFFDGPTQAEVTKQYQLGAVGLPAMQQYWAFGYHQCRWGYNWMMQDQVVDNF 418
      ***.*****. .*****: **:*:*****:*****:*****:*. :*. *

A. melanogenum CBS 110374 AKFGIPILETIWNDIDYMFQYRDFENDPNTFPYDQGMFIDGLHGNNQHYVTIVDSALYIP 442
A. namibiae CBS147.97 AKFGIPILETIWNDIDYMFQYRDFENDPNTFPYDQGEKFIGDLHGANGQHYVTIVDSAIYIP 450
A. pullulans EXF-150 AKFEIPILETIWNDIDYMFQYRDFENDPNAFPYEQGGKFIDELHGANGQHYVPIVDSAIYHP 477
A. subglaciale EXF-2481 AKFEIPMETIWNDIDYMFQYRDFENDPNTFPYDQGKQFIDGLHGANGQHYVTIVDSAIYIP 453
A. pullulans AKFEIPMETIWNDIDYMFQYRDFENDPNTFPYDQGKQFIDGLHGANGQHYVTIVDSAIYIP 478
      *** *:*****:*****:***:*: * * * . * .*** * * * : *

```

Figura 28: Alineamiento múltiple de α -glucosidasas de cuatro variedades de *Aureobasidium*: *melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21).

Posteriormente, se analizó la proteína de 72 kDa presentó una homología mayor al 95 % con una glicosil hidrolasa de la familia GH15, proveniente de *Aureobasidium subglaciale* EXF-2481 con número de acceso XP_013341216.1. Al realizar la búsqueda en **Carbohydrate-Active enZymes Database** (<http://www.cazy.org/>) y se determinó que dentro de la familia GH15 se encuentran clasificadas enzimas como glucoamilasa, glucodextranasa, dextran dextrinasa, entre otras, las cuales tienen un modo de acción de inversión y una estructura $(\alpha/\alpha)_6$, por lo que se sugirió que se trataba de una glucoamilasa.



Para asegurar dicha información se consideraron los péptidos obtenidos: **LPDYEYDWVR**, **DAMFHYAEG**, **RAVEQTDPSTLTFAGLGEPK**, **DSNGLPLAIPGRY**, **QGWGDYIR** y **YHTPAGGNLAEFNR** para realizar un alineamiento múltiple en **UniprotKB** (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), con glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium*; *pullulans*, *melanogenum*, *namibiae* y *subglaciale*, en la figura 29 se presenta dicho alineamiento, el cual indica que la banda de 72 kDa es una glucoamilasa. Los números de acceso están entre paréntesis. Los residuos de aminoácidos en azul cian indican que son conservados, mientras que los amarillos representan cambios.

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

A. subglaciale EXF-2481 SKKRMFLNINPDIDGAAKGTVVAARSGPSYDQKLPDYEYDWVRDSSLTMEVVEFLYAAST 238
A. namibiae CBS 147.97 SKSRMFLNINPDIDGAAKGTVVAARSGPSYDQKLPDYEYDWVRDSSLTMDVVRSLYAAST 240
A. pullulans EXF-150 SKTRMFLNINPDIDGAAKGTVVAARSGPSYEQQLPDYEYDWVRDSSLTMDVVRALYSAST 240
A. melanogenum CBS 110374 SKTHMFLNINPDIDGAVKGTVVAARSGPSYDQKLPDYEYDWVRDSSLTMDVVRQSLYAAASR 240
*.:*****.*****.*:*****.*** **:*

A. subglaciale EXF-2481 NDKFTRKYKDAMFHYAEGRAVEQTDPSLTFAGLGEPKFYLNNTAFTGPWGRPQNDGPATA 298
A. namibiae CBS 147.97 VDKFTRKYKDAMFHYAEGRAVEQNDPSLTFAGLGEPKFYLNNTAFTGPWGRPQNDGPATA 300
A. pullulans EXF-150 VDSFTRKYKDAMFHYAEGRAVEQNDPSLTFAGLGEPKFYLNNTAFTGPWGRPQNDGPATA 300
A. melanogenum CBS 110374 VDKLTRKYKMLFHYAQGRAVEQTDPSLTFAGLGEPKFYLNNTAFTGPWGRPQNDGPATA 300
*.:***** :****:*****.*****.*****.*****

A. subglaciale EXF-2481 PVLAKNSFDIIVILGVIHGYAGDGVYSYTNDRVLSALKISTSFLDVYPIAKTKDSN 478
A. namibiae CBS 147.97 PVLAKNSFDIIVILGVIHGYAGDGVYSYTNDRVLSALKISTSFLDVYPIAKTKVQDSK 480
A. pullulans EXF-150 PVLAKNSFDIIVILGVIHGYAGDGVYSYTNDRVLSALKISTSFLDVYPIAKTKDSK 480
A. melanogenum CBS 110374 PVLHGKSSFIDIAVILGVIHGYAGDDVYSYTNDRVLSALKISTSFLDVYPIANVTKASN 480
*** **.:*****.*****:*****.*****.*****.***** :*::: *

|
A. subglaciale EXF-2481 GLPLAIPGRYPEDVYNGVGTSPNGGNPWYLTTATMAQYLYSAALEYQKSGSLTVSNVTA 538
A. namibiae CBS 147.97 SLPLGIPIGRYPEDVYNGVGTSPNGGNPWYLTTATMAQYLYSVASEYQNAAGSLTVNNVTA 540
A. pullulans EXF-150 GLPIGIPIGRYPEDVYNGVGTSPNGGNPWYLTTATMAQYLYSAASEYQTAGTLTVNNVTA 540
A. melanogenum CBS 110374 GLPLGIPIGRYPEDVYNGVGTSSNGGNPWYLTTATMAQYLYSVASELQTAGSLTVNNVTA 540
*.:*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

A. subglaciale EXF-2481 PFFAYYAPKAGLKTGKTYSSNTKEFASVIASLQGWGDYIRRIKYHTPAGGNLAEFNRN 598
A. namibiae CBS 147.97 PFFAYYAPKAGLKS-RTYSSDTKEFASVIASLKGWGDYIRRIKYHTPAGGNLAEFNRN 599
A. pullulans EXF-150 SFFAYYAPKSGLKIGKAYSNTKEFASVIASLKGWGDYIRRIKYHTPAGGNLAEFNRN 600
A. melanogenum CBS 110374 PFFAYYAPAAGLKLKSPYSNTQEFASVIASLKGWGDYIRRIKYHTAAGGNLAEFNRN 600

```

Figura 29: Alineamiento múltiple de glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium*: *melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21).



Finalmente, se determinó que la proteína de 64 kDa se trata de una Glucoamilasa con una homología mayor al 95 % con otra Glucoamilasa de *Aureobasidium namibiae* CBS 147.97, se obtuvieron nueve péptidos: **ATGSLASWLSSENVAL**, **GVLNNIGASGSK**, **SDPNYFYTWTR**, **ALVDQFIAGNKSLEPPLIQQYISAQANLQTVN**, **NPSGGLCS**, **GGLAEPKFEVNLTPF**, **GSISITSISLPFFK**, **YTPSSGALSEQYN** **RADGTPLSAVDLTWSYAAFLTAYNAR**, **WTVTISFAPGTSFQYK**.

Usando dichos péptidos se realizó un alineamiento múltiple en **UniprotKB** (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), con glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium*; *pullulans*, *melanogenum*, *namibiae* y *subglaciale*, para comprobar que la banda de 64 kDa es una glucoamilasa. Los números de acceso se indican entre paréntesis. Los residuos de aminoácidos en azul cian indican que son conservados, mientras que los amarillos representan cambios (figura 30).



CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

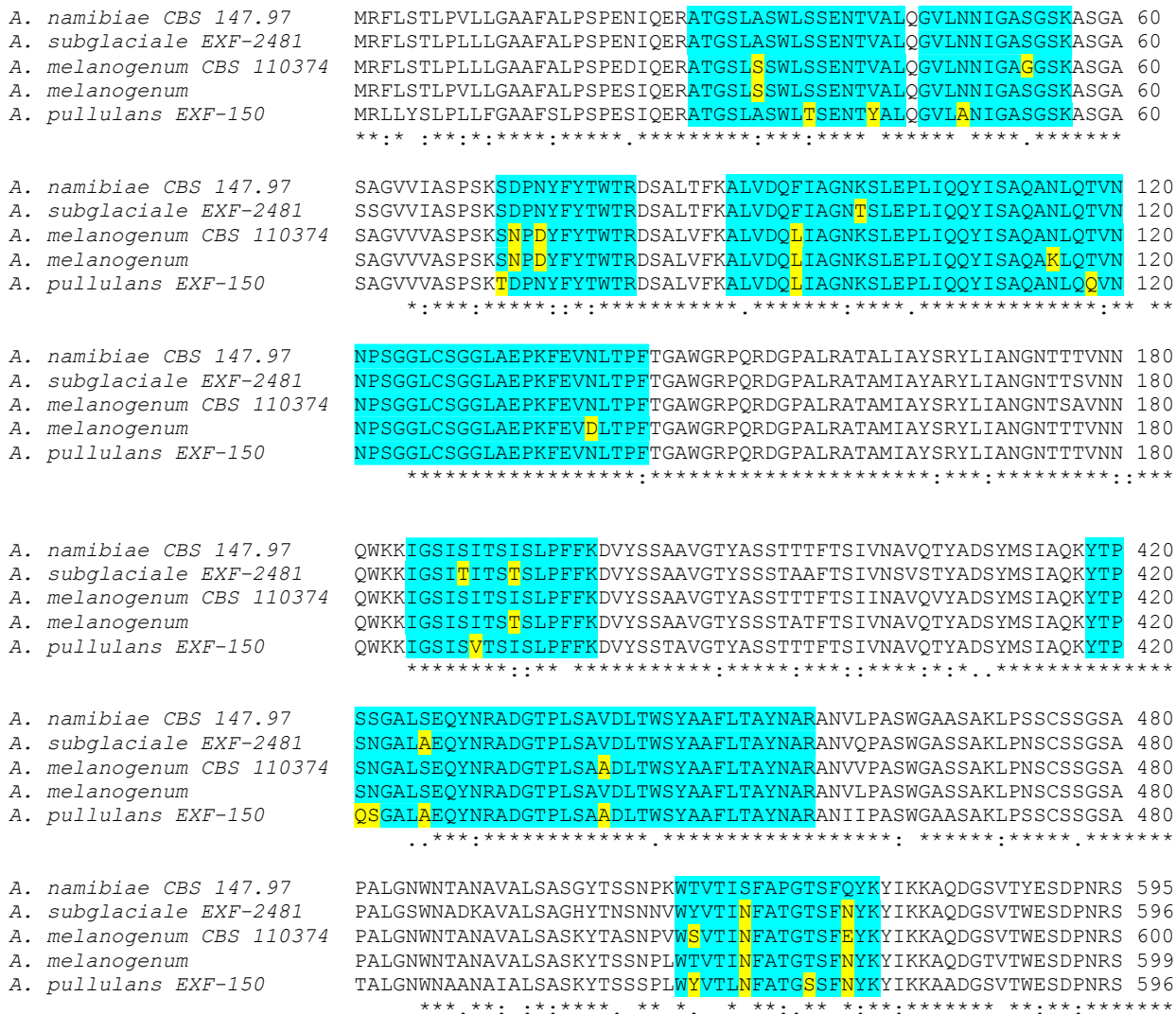


Figura 30: Alineamiento múltiple de glucoamilasas de cuatro variedades de *Aureobasidium: melanogenum* CBS 110374 (A0A074VNI7), *namibiae* CBS 147.97 (A0A074W6E3), *pullulans* EXF-150 (A0A074YJE8), *subglaciale* EXF-2481 (A0A074YQQ3), *pullulans* (A0A1A7MS21).

3.9 Producción de oligosacáridos

En la figura 31, se presenta el análisis por TLC de los productos de hidrólisis de almidón de cebada usando las fracciones colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico. De acuerdo a los marcadores utilizados, se produce glucosa y oligosacáridos de diferente peso molecular usando fracciones enzimáticas.

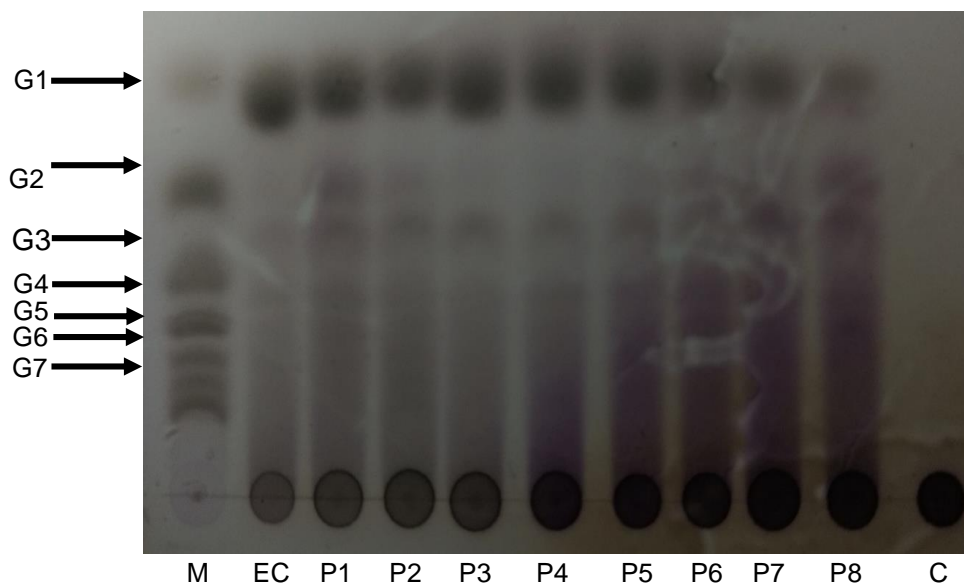


Figura 31. Análisis de los productos hidrólisis de almidón de cebada, usando fracciones de cromatografía de intercambio aniónico como fuente enzimática. M: estándares, glucosa (G1), maltosa (G2), maltotriosa (G3), maltotetraosa (G4), maltopentaosa (G5), maltohexaosa (G6) y maltoheptaosa (G7). EC: Extracto enzimático crudo. P1: 70-73, P2: 74-77, P3: 78-80, P4: 81-85, P5: 86-89, P6: 90-93, P7: 94-101 y P8: 102-120. C: control.



3.10 Microscopía electrónica de Barrido (SEM) de almidón

Se caracterizaron de los gránulos de almidón de cebada por Microscopía electrónica de Barrido (SEM) antes y después del tratamiento con HCl 6% (v/v), en la etapa final de la extracción. En la figura 32 se presentan las imágenes; las figuras 32a corresponden almidón de cebada sin tratamiento; se observaron dos tipos de estructuras; gránulos de entre 2 y 5 μm de forma esférica y otros entre 10 y 25 μm de forma lenticular, con un diámetro de 12.7 μm , lo cual corresponde a la distribución bimodal reportada por (Vasanthan y Hoover, 2009).

En la misma figura (32b), se presentan las imágenes corresponden a almidón de cebada con tratamiento con HCl, se observaron menos gránulos de tamaño de 2 a 5 μm , debido, posiblemente a que estas estructuras son fueron hidrolizados al someterlos a tratamiento ácido. Sin embargo, los gránulos lenticulares se observaron intactos; el ácido no altero la morfología, ni provoco daños en la superficie, la cual se observó que es lisa, sin poros ni grietas.

También se caracterizaron gránulos de almidón soluble de papa y de maíz. En la figura 33, se presentan las micrografías SEM de almidón soluble (figura 33a); se observó una morfología ovoide con superficie lisa; un tamaño que varía de 25 a 50 μm , con un diámetro promedio de 30 μm (figura 33b) (Singh et al. 2003). En la figura se 34 observan las micrografías SEM que corresponden a almidón de maíz. En la figura 13a se observan los gránulos; presentan una forma poliédrica de superficie lisa, con un tamaño de 8 a 20 μm con un diámetro promedio de 12 μm (figura 13b), no presenta poros, ni fisuras en la superficie. (Naguleswaran et al. 2012, Dura et al. 2014).

Esta caracterización fue de gran importancia, debido a que a través de la observación por microscopia es posible conocer la morfología, el tamaño de los gránulos de almidón y observar los cambios superficiales debido a la acción de las enzimas al hidrolizarlo.

De acuerdo a Naguleswaran et al. 2013, las enzimas α -amilasa y glucoamilasa inician la hidrólisis sobre la superficie granular generando pequeños poros y canales a través de los cuales las enzimas tiene acceso al interior del gránulo. El grado de hidrólisis depende de la fuente botánica de almidón, la estructura que éste presente, de la relación de amilosa y amilopectina que contenga. Por lo tanto, al realizar un análisis por SEM es posible conocer la susceptibilidad de cada tipo de almidón ante el proceso de hidrólisis enzimática.

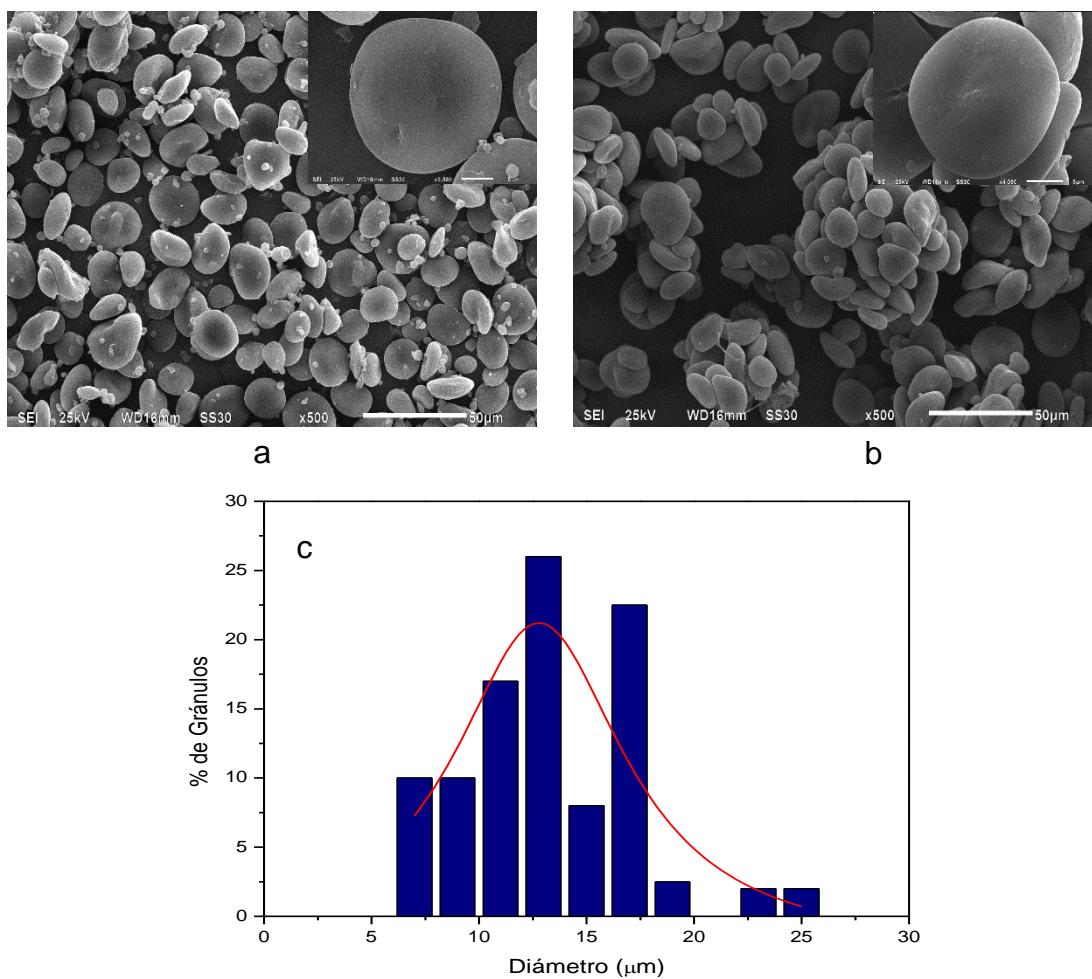


Figura 32. Micrografías SEM de almidón de cebada con tratamiento con HCl (a), sin tratamiento con HCl (b), distribución del tamaño de los gránulos (c).

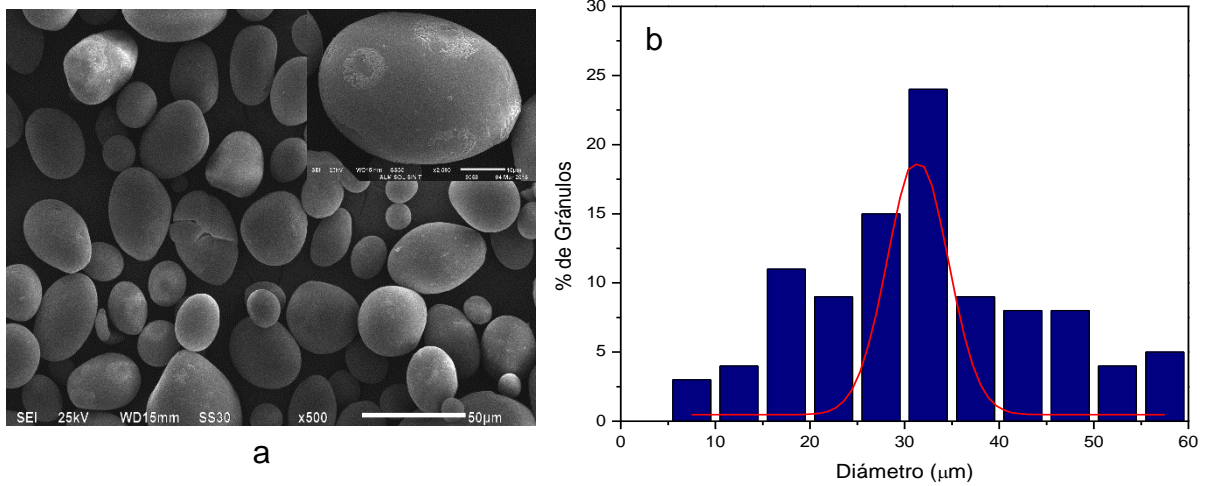


Figura 33. Micrografías SEM de almidón de soluble de papa (a), distribución del tamaño de los gránulos (b).

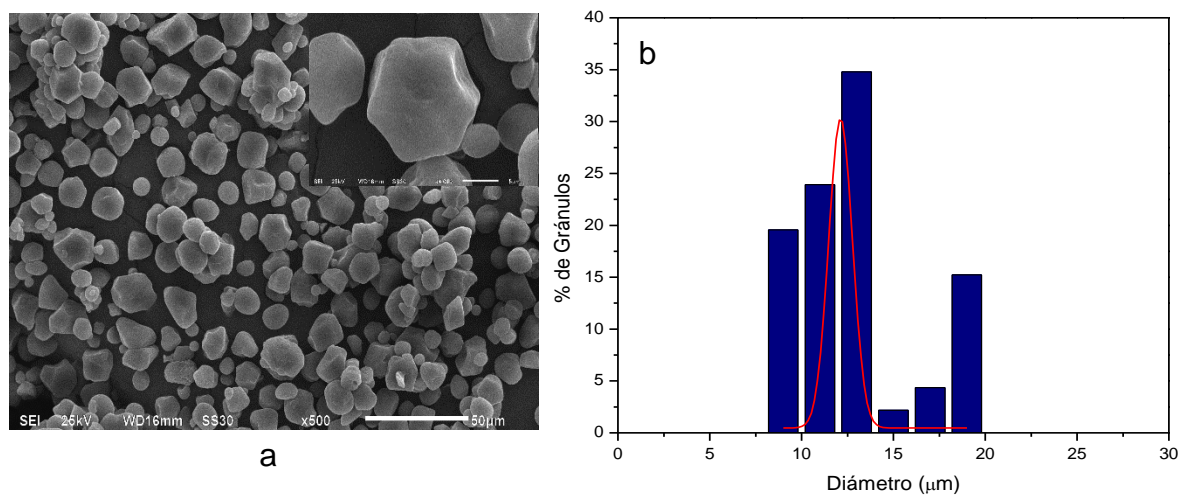


Figura 34. Micrografías SEM de almidón de maíz (a), distribución del tamaño de los gránulos (b).



Conclusiones

- Se produjeron extractos enzimáticos crudos por *Aureobasidium pullulans* a partir de almidón de cebada en cultivos en lote a nivel fermentador.
- Al evaluar el perfil de actividad enzimática se detectaron tres enzimas amilolíticas por zimograma, las cuales fueron de 152 kDa, 72 kDa y 64 kDa, identificadas por secuenciación como α -glucosidasa y dos glucoamilasas, respectivamente
- Se logró la purificación parcial de las enzimas α -glucosidasa (152 kDa) y glucoamilasa (72 kDa) y por cromatografía de intercambio aniónico, catiónico y filtración en gel.
- Se produjeron oligosacáridos de diferente peso molecular (G3-G7), a partir de almidón de cebada empleando diferentes fracciones como fuente enzimática.



Referencias

- Aguilar J. y Schwentesius R. (2004) La producción de cebada Maltera en México, ventaja comparativa no capitalizada, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM).
- Bagheri A., Khodarahmi R., Mostafaie A. (2014) Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*. Relation to starch processing. Food Chem. 161: 270-278.
- Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V.S. (2002) Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. Crit. Rev. Biotechnol. 22:375-407.
- Botella C., Ory I., Webb C., Cantero D. y Blandino A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. Biochem. Eng. J. 26 (2-3):100-106.
- Bravo J. C., Calvo C., Flores A., Lopez E. (2003) Purification and biochemical characterization of a soluble α -glucosidase from the parasite *Entamoeba histolytica*. Antonie van Leeuwenhoek 84:169-178.
- Cano C. Santiago A., Rivera F. N., Pineda R. M., Zúñiga G., Hidalgo M. E. (2017) One-step zymogram method for the simultaneous detection of cellulase/xylanase activity and molecular weight estimation of the enzyme. Electrophoresis 38: 447-451.
- Carbohydrate-Active enZymes Database, (CAZY) 2018 consultado en: <http://www.cazy.org/>
- Castilho L. R., Medronho R. A., Alves T. L. M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Biores. Technol. 71 (1): 45-50.
- Chen M., Qin Y., Liu Z., Liu K., Wang F., Qu Y. (2010) Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of



corn cob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme Microb Tech* 46: 444-449.

Cheng K. C., Demirci A., Catchmark J. M. (2011) Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:29-44.

Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:793-804.

Cozzolino D., Roumeliotis S., Eglinton J. (2013) Relationships between starch pasting properties, free fatty acids and amylose content in barley. *Food Res Int.* 51:444-449.

De Palma F. E. R., Gomes E., Da Silva R. (2002) Purification and Characterization of Two β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Folia microbial* 47:685-690.

Duedahl L., Matthias K., Zimmermann W. (2000) Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydr. Res.* 329:97-107.

Dura A., Blaszczyk W., Rosell C.M. (2014) Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydr. Polym.* 101: 837-845.

Espitia L. Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, 2009.

Eyzaguirre J., Hidalgo M., Leschot A. (2005) β -Glucosidases from Filamentous Fungi: Properties, Structure, and Applications. En: *Handbook of Carbohydrate Engineering*, Taylor & Francis Group, LLC. pp 645-685.

Frade M. D., Hernández A., Flores A., Mora H. M. (2010) Biochemical characterization of *Candida albicans* α -glucosidase I heterologously expressed in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:291-298.

Gangadharan D., Nampoothiri M., Sivaramakrishnan S., Pandey A. (2009) Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158:653-662.



- Gostinčar C., Ohm R. A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J. Zalar P., Grube M., Sun H., Han J., Sharma A., Chiniquy J., Ngan C. Y., Lipzen A., Barry K., Grigoriev I. V., Gunde-Cimerman N. (2014) Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* 15:549-577.
- Goyal N., Gupta K.J. y Soni K.S. (2005). A novel raw digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb. Technol.*
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami K. V., Chauhan B. (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38:1599-1616.
- Hayashi S., Sako S., Yokoi H., Takasaki Y., Imada K., (1999) Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22: 160-163.
- Hernández N. A. (2011) Evaluación de la actividad amilolítica y producción de ácido glucónico de *Aureobasidium pullulans* en cultivos por lote y semilote utilizando almidón extraído de cebada maltera de baja calidad. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. México.
- Horváthová V., Janecek S., Sturdík E. (2000) Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia, Bratislava* 55:605-615.
- Jennylynd J., Byong L. (1997) Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology- a review. *J. Food Biochem.* 21: 1-52.
- Konsula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. (2004) Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 39:1745-1749.
- Kumar P., Satyanarayana T. (2009) Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29: 225-255.
- Kumar S., Khare S.K. (2012) Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming α -amylase from moderately halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. *Bioresour. Technol.* 116: 247-251.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.



-
-
- Li B., Zhang N., Peng Q., Yin T., Guan F., Wang G., Li Y. (2009) Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:293-300.
- Li H., Chi Z., Duan X., Wang L., Sheng J. y Wu L. (2007a) Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. *Process Biochem.* 42: 462-465.
- Li H., Chi Z., Wang X., Duan X., Gao L., (2007) Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1006-1012.
- Li X. L. y Ljungdahl L. G. (1994) Cloning, sequencing, and regulation of a xylanase gene from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3160-3166.
- Li X. L., Zhang Z. Q., Dean J.F. D., Eriksson K. E. L, Ljungdahl L. G. (1993) Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3212- 3218.
- Liu X. D., Xu Y. (2008) A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresour. Technol.* 99: 4315-4320.
- Liu Z. Q., Chi Z.M., Wang L., Li J. (2008a) Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochem. Eng. J.* 40:445-451.
- Liu Z. Q., Li X. Y., Chi Z. M., Wang L., Li J., Wang X. H. (2008b) Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:245-255.
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 267–275.
- Ma C. L., Ni X.M., Chi Z.M., Ma L.Y. y Gao L.M. (2007) Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium*



-
-
- pullulans* for bioactive peptide production from different sources. *Mar Biotechnol.* 9:343-351.
- Martínez T. F., Alarcón F. J., Díaz M., Moyano F. J. (2000) Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis* 21:2940-2943.
- Michelin M., Ruller R., Ward R. J., Moraes L., João J., Terenzi H. F., Polizeli M. L. (2008) Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:17–25.
- Michelin M., Silva T., Benassi V., Peixoto -Nogueira S., Moraes L., Leão J., João A., Terenzi H., Polizeli M. (2010) Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.* 345: 2348-2353.
- Miller G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Moon I., Cho G. (1997) Production of maltooligosaccharides from starch and separation of maltopentaose by adsorption of them on activated carbon (I). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2:19-22.
- Moracci M., Trincone A., Rossi M. (2001) Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11:155-163.
- Mounir R., Durieux A., Bodo C., Allard C., Simon J. P., Achbani E. H., El-Jaafari S., Douira A., Jijakli M.H. (2007) Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol. Lett.* 29:553-559.
- Nagarajan D. R., Rajagopalan G., Krishnan C. (2006) Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming α -amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 73:591-597.
- Naguleswaran S., Li J., Vasanthan T., Hoover R., Bressler D. (2012) Amylolysis of large and small granules of native triticale, wheat and corn using a mixture of α -amylase and glucoamylase. *Carbohydr. Polym.* 88:864-784.



-
-
- Naguleswaran S., Vasanthan T., Hoover R., Bressler D. (2013) The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starches toward amyolysis at sub-gelatinization temperatures. *Food Res. Int.* 51:771-782.
- Nakakuki T. (2003) Development of Functional Oligosaccharides in Japan. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 15:57-64.
- Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M., Claeysens M., Stals I., Hoschke Á. (2002) Purification and characterisation of amyolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme Microb. Technol.* 31:345-352.
- Ni X. M., Chi Z. M., Ma C. L., Madzak C. (2008) Cloning, characterization, and expression of the gene encoding alkaline protease in the marine yeast *Aureobasidium pullulans* 10. *Mar Biotechnol.* 10:319-327.
- Nielsen S.S. (2010) Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. En: *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer Science.
- O'Brien S., Wang Y. J. (2008) Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. *Carbohydr. Polym.* 72:597-607.
- Okuyama M., Tanimoto Y., Ito T., Anzai A., Mori H., Kimura A., Matsui H., Chiba S. (2005) Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme Microb. Technol.* 37: 472-480.
- Oliveira L. A., Porto A. L. F. y Tambourgi E. B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 97:862-867.
- Pandey A., Nigam P. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl Biochem.* 31:135-52.
- Park J. E., Park S. H., Jung Y. W., Hwang H. S., Cha J., Lee H. (2013) Enzymatic Properties of a Thermostable α -Glucosidase from Acidothermophilic Crenarchaeon *Sulfolobus tokodaii* Strain 7. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 56-63.
- Patel S., Goyal A. (2011) Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1119-1128.



-
-
- Perugino G., Trincone A., Mose R. y Moracci M., (2004) Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol.* 22:31-37.
- Prieto M.J., Rubio H.C.U., Román G.A.D., Méndez M.M.A., González R.C.A., Prieto G.F. (2009) Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias.* 9: 115-125.
- Quintos G.J., Delgadillo D.M., Prieto G.F. y Román G.A.D. (2009). Aislamiento y caracterización de almidón de cebada (*Hordeum vulgare*) de la variedad esmeralda de los municipios de Apan y Almoloya Hidalgo, "Memorias". XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos. Monterrey, Nuevo León. 31 de Agosto y 1 de Septiembre. CD-ROM
- Rana N., Walia A., Gaur A. (2013) α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 36:9-17.
- Ribeiro L. S., Gomes E., Silva R. (2007a) Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem.* 42:1101-1106.
- Ribeiro L.S., Ferreira A.P.H., Cabral H., Pagnocca F.C., Gomes E., Da Silva R. (2007b). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 43:391-395.
- Robyt J. (2008) Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology. In: *Glycoscience*, Fraser-Reid B.O., Tatsuta K., Thiem J. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1437-1472
- Rodrigues M. C., Neri I. A., Bueno J., Paulino B. N., Gabriel M., Pastore G. M. (2018) Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:17-37.
- Saha B., Bothast R. (1993) Starch conversion by amylases from *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 12:413-416.



-
-
- Saha B., Freer S. N., Bothast J. (1994) Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. J. Appl. Environ. Microbiol. 60:3774-3780.
- Saha B., Silman R., Bothast R. (1993) Amylolytic Enzymes Produced by a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. Curr Microbiol. 26:267-273.
- Sarian F. D., van der Kaaij R. M., Kralj S., Wijbenga D. J., Binnema D. J. y van der Maarel M. J. (2012) Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium aurum* strain B8 A. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 645-654.
- Secretaria de Economía (2003). Norma Mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-cereal-cebada maltera-(*Hordeum vulgare* L. y *Hordeum distichum* L.)-Especificaciones y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. 6 de noviembre de 2003.
- Silva M. T., Angelis D. A., Carvalho A. A. F., Silva R., Boscolo M., Gomes E. (2005) Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylase by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. J. Microbiol. 43:561-568.
- Silva T. M., Maller A., de Lima A. R., Michelin M., Ward R. J., Yoshico I., Atilio J., Terenzi H. F., de Polizeli M. L. (2009) Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:1439-1446.
- Singh N., Singh J., Kaur L., Singh N., Singh B. (2003) Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Food Chem. 81: 219-231.
- Talens D., Polaina J. y Marín J. (2016) Enzyme engineering for oligosaccharide biosynthesis. En: Frontier discoveries and innovations in interdisciplinary microbiology. Shukla P. (editor) Springer, New York, pp 9-31.
- Thirunavukkarasu M., Priest F. G. (1984) Purification and characterization of an extracellular and a cellular α -glucosidase from *Bacillus licheniformis*. J. Gen. Microbiol. 130:3135-3141.



-
-
- Uthumporn U., Shariffa Y. N., Fazilah A., Karim A. (2012) Effects of NaOH treatment of cereal starch granules on the extent of granular starch hydrolysis. *Colloid Polym. Sci.* 290:1481-1491.
- Uthumporn U., Zaidul I.S.M., Karim A. (2010) Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food Bioprod. Process* 88:47-54.
- Vasanthan T., Hoover R. (2009) Barley Starch: Production, Properties, Modification and Uses. En: *Starch: Chemistry and Technology*. BeMiller J. and Whistler R. (editors). Third Edition, Elsevier Inc.
- Wang L., Wang Y.J. (2004) Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.* 39:291-296.
- Wang Q., Wang X., Wang X., Ma H. (2008) Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochem.* 43:280-286.
- Watanabe A., Suzuki M., Ujiie S., Gomi K. (2016) Purification and enzymatic characterization of a novel β -1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng.* 121: 259-264.
- Yoon J. J., Kim K. Y., Cha C. J. (2008) Purification and characterization of thermostable β -glucosidase from the brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. *J. Microbiol.* 46: 51-55.
- Zalar P., Gostinčar C., de Hoog G. S., Uršič V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N. (2008) Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* 61:21-38.

1 **APROVECHAMIENTO DE ALMIDÓN DE CEBADA DE MALA CALIDAD PARA**
2 **LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR *Aureobasidium pullulans***

3
4 **USE OF LOW QUALITY BARLEY STARCH FOR THE PRODUCTION OF**
5 **AMYLOLYTIC ENZYMES BY *Aureobasidium pullulans***
6
7

8 **RESUMEN**

9 La cebada de baja calidad rechazada para el proceso de producción de malta puede ser
10 utilizada para la obtención de productos de valor agregado, particularmente enzimas. En este
11 trabajo se extrajo almidón crudo de cebada y se usó para producir enzimas amilolíticas por
12 *Aureobasidium pullulans*. Utilizando 50 g/l de almidón, se produjeron glucoamilasa, α -
13 amilasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa con actividades máximas de 193,6 U/ml, 7,4 U/ml,
14 8,16 U/ml y 8,5 U/ml, respectivamente. A las 30 h de fermentación se obtuvo un extracto
15 enzimático crudo, se utilizó para sacarificar almidón de tres fuentes a 10 g/l: cebada, soluble
16 (papa) y maíz. La reacción de sacarificación se evaluó bajo tres condiciones: agua, solución
17 tampón de acetato y la adición de Ca^{2+} a cada uno de los medios de reacción. El agua y
18 adicionar Ca^{2+} tuvo un efecto positivo resultando una concentración máxima de glucosa de
19 3,84, 0,84 y 0,4 g/l para almidón de cebada, soluble y de maíz, respectivamente.
20 Posteriormente, se evaluó la gelatinización del almidón y finalmente se realizaron
21 experimentos aumentando la concentración de almidón (50 a 400 g/l). La gelatinización del
22 almidón fue positiva para el almidón soluble y de maíz, aumentando la hidrólisis en 23 % y
23 25 %, respectivamente. El incremento de la concentración de almidón, a 50 g/l aumentó la
24 hidrólisis en 3.29, 40 y 42 % para almidón de cebada, soluble y de maíz, respectivamente.

25 Este trabajo demuestra que el almidón de cebada de baja calidad puede ser aprovechado para
26 la obtención de productos de valor agregado, como las enzimas.

27 Palabras clave: cebada, *Aureobasidium pullulans*, sacarificación, glucoamilasa, α -amilasa,
28 α -glucosidasa, β -glucosidasa

29

30

ABSTRACT

31 Low quality barley that has been rejected of malt production process can be used for the
32 production of value added products. Hence, in this work the starch was extracted and used to
33 produce amylolytic enzymes by *Aureobasidium pullulans*. Using a 50 g/l of barley raw
34 starch, glucoamylase, α -amylase, α glucosidase and β -glucosidase enzymes were produced
35 with maximum activities of 193 U/ml, 7.4 U/ml, 8.1 U/ml y 8.5 U/ml, respectively. At 30 h
36 of fermentation was obtained a crude extract that was used as enzymatic source for the
37 saccharification of starch from three sources at 10 g/l: barley, soluble from potato and corn.
38 First, were evaluated two reaction solvents (water and acetate buffer) and the addition of
39 calcium (Ca^{2+}). In the second, the starch gelatinization was evaluated and finally were
40 conducted experiments varying the starch concentration (from 50 to 400 g/l). Using water as
41 solvent and Ca^{2+} addition had a positive effect resulting in a maximum glucose concentration
42 of 3.84, 0.84 and 0.4 g/l from barley, soluble and corn starches respectively. In the other
43 hand, starch gelatinization was positive for soluble and corn starches, enhancing hydrolysis
44 in 23 % and 25 % respectively. In case of increasing the starch concentration, that of 50 g/l
45 was the best condition, enhancing hydrolysis in 3.29 %, 40 % and 42 % from barley, soluble
46 and corn starches respectively. This work demonstrates that low quality raw barley starch
47 can be usable for the production of value added products such as enzymes.

48 Key words: barley, *Aureobasidium pullulans*, saccharification, α -amylase, glucoamylase, α -
49 glucosidase, β -glucosidase

50

51

INTRODUCCIÓN

52 Los productos obtenidos a partir de fuentes renovables, como los residuos agroindustriales o
53 materias primas de bajo costo, son de especial interés debido a que permiten aminorar el
54 impacto ambiental reduciendo fuentes de contaminación o bien los costos en el tratamiento
55 y disposición de dichos residuos en la industria. En décadas anteriores se ha buscado una
56 oportunidad de aprovechamiento tanto de residuos, como de materias primas que no cumplen
57 con los requerimientos necesarios para procesos industriales. Un ejemplo de esto es la cebada
58 maltera, la cual debe cumplir con especificaciones y parámetros para ser utilizada en el
59 proceso de malteo para la producción de cerveza ya que este es su único mercado en el país
60 (Aguilar y Schwentesius, 2004). En México, de acuerdo a la Organización de Alimentos y
61 Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés, 2016) desde hace varias décadas se incrementó
62 la producción de cebada maltera. Según datos del Servicio de Información Agroalimentaria
63 y Pesquera (SIAP) hasta finales del 2016, los principales estados productores de cebada
64 maltera fueron Guanajuato (372,167 ton), Hidalgo (268,595 ton), Tlaxcala (83,469 ton),
65 Puebla (68,508 ton), y el Estado de México (66,393 ton), representando el 39, 28, 9, 7.5, y 7
66 % de la producción nacional respectivamente.

67 De acuerdo con la norma NMX-FF-043-SCFI-2003, una cebada de buena calidad debe
68 cumplir con varias especificaciones: la humedad (11.5 % y 13.5 %), la germinación mínima
69 (85 %), el grano dañado (máximo 10 %), el peso hectolítrico mínimo (de 56 y 58 kg/hl para
70 cebada de seis y dos hileras, respectivamente), y los parámetros como color, olor y tamaño,
71 los cuales son dependientes de las condiciones medioambientales que prevalecen durante el

72 desarrollo y maduración del grano. Sin embargo, en México, cada año grandes cantidades de
73 cebada que no cumplen con dichas especificaciones y parámetros son rechazadas por la
74 industria maltera. Esta cebada de baja calidad no tiene prácticamente otro nicho de mercado,
75 y suele ser utilizada como alimento para ganado (Aguilar y Schwentesius 2004).

76 Por otra parte, diversos tipos de residuos agroindustriales con alto contenido de celulosa,
77 hemicelulosa, xilano, lignina y pectina, como el bagazo de caña, residuos de uva, cáscara de
78 avena y trigo, entre otros. Se han utilizado como sustratos para producción y evaluación de
79 sistemas enzimáticos, principalmente de aquellas que son inducibles, principalmente las
80 celulasas (Botella et al. 2005), las xilanasas, las proteasas (Oliveira et al. 2006, Suvarna et al.
81 2009), las pectinasas (Castilho et al. 2000) y las lipasas (Godoy et al. 2009). En el caso de la
82 cebada es posible aprovechar el almidón que representa en promedio 53% del peso del grano
83 (Vasanthan y Hoover 2009), para la obtención de productos de valor agregado como enzimas
84 amilolíticas de importancia industrial.

85 Djekrif et al. 2015, reportaron que levaduras como: *Cryptococcus*, *Trichosporon*,
86 *Saccharomycopsis*, *Lipomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Clavispora*, *Filobasidium* y
87 *Aureobasidium* que producen enzimas amilolíticas (α -amilasas, glucoamilasas, glucosidasas,
88 pullulanasas, y ciclodextrinasas), a partir de diferentes sustratos, por lo que pueden ser
89 aplicadas en la industria de la sacarificación del almidón. *Aureobasidium pullulans* produce
90 al menos cuatro tipos de enzimas amilolíticas extracelulares usando diferentes sustratos para
91 su inducción (Saha et al. 1993). Estas son: glucoamilasa; exoenzima que hidroliza los enlaces
92 α -1,4 y α -1,6 para liberar D-glucosa a partir de almidón y polisacáridos similares (Sauer et
93 al. 2000). La α -glucosidasa; es una exoenzima que hidroliza los enlaces α -1,4, liberando
94 glucosa, de manera menos eficiente que la glucoamilasa (Tomasik y Horton, 2012). La β -

95 glucosidasa; es una endoenzima que hidroliza los enlaces β -glucosídicos de la estructura
96 interna del almidón, liberando glucosa como principal producto (Hayashi et al. 1999). La α -
97 amilasa; es una endoenzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos en
98 almidón, liberando productos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa y maltotriosa
99 (Demirkan et al. 2005). Las enzimas amilolíticas son de gran importancia en aplicaciones
100 biotecnológicas, no solo en la sacarificación de almidón, sino en diferentes industrias como
101 la textil y la papelera (Gupta et al. 2003; Rana et al. 2013).

102 Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue la producción de enzimas amilolíticas usando
103 la levadura *A. pullulans* a partir de almidón de cebada de baja calidad como sustrato y su
104 aplicación en la sacarificación de almidón proveniente de distintas fuentes, bajo diferentes
105 condiciones de temperatura, tiempo y concentración de sustrato para la producción de
106 glucosa.

107 **MATERIALES Y MÉTODOS**

108 **Aislamiento de almidón a partir de granos de cebada**

109 La cebada (*Hordeum vulgare*) de baja calidad se obtuvo con un productor local en el Estado
110 de Hidalgo, México. La etapa de limpieza consistió en retirar las impurezas de mayor tamaño
111 (piedras, restos florales, otros granos, etc.). Posteriormente, se realizó un proceso de perlado,
112 el cual consistió en hacer pasar el grano de cebada en una licuadora industrial por 50
113 segundos, para retirar la cascarilla y obtener un grano íntegro. El aislamiento de almidón se
114 realizó de acuerdo a Wang y Wang 2004, con algunas adecuaciones. La harina de cebada se
115 obtuvo con un molino para granos y especias, ajustando la apertura de los discos para obtener
116 un polvo ligeramente granuloso, que fue macerado con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 %
117 a una relación de 1:2 (m/v) durante 18 h a 4 °C para remover las proteínas y lípidos que se

118 encuentran unidos a los gránulos de almidón y favorecer la separación (Uthumporn et al.
119 2012). La mezcla se hizo pasar por los tamices No. 100 y 200 US lavando con agua destilada,
120 en cantidad necesaria para retirar todo el almidón. La suspensión obtenida se centrifugó 15
121 min a 9240 g y 4 °C, a partir del pellet, se separó el almidón, se secó a 30 °C por 24 h en un
122 horno (Serna 2001).

123 Finalmente, se aplicó un pretratamiento con ácido clorhídrico (HCl) al 6 % para favorecer la
124 hidrólisis durante las cinéticas de crecimiento. Se mezcló el almidón de cebada y HCl en una
125 relación de 1:3 (p/v), se ajustó el pH a 5.5 y se mantuvo en agitación durante 6 h, se centrifugó
126 descartando el sobrenadante en las mismas condiciones descritas anteriormente, se dejó secar
127 a temperatura ambiente, se molió en mortero y se conservó a temperatura ambiente para su
128 posterior uso.

129 **Microorganismo y condiciones de cultivo a nivel matraz**

130 La cepa de la levadura *Aureobasidium pullulans* usada para la producción de enzimas
131 amilolíticas fue ATCC®15233™. Para la propagación, se formuló un medio de cultivo
132 ajustando la cantidad de almidón de cebada y fuente de nitrógeno (NH₄Cl) para obtener tres
133 relaciones carbono: nitrógeno (C:N) de 8, 15 y 20. Adicionalmente el medio contenía en (g/l)
134 la siguiente composición: extracto de levadura 5, MgSO₄·7H₂O 0.2, KH₂PO₄ 0.3, CaCO₃ 5 y
135 Tiamina 0.001. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer con 250 ml de
136 medio, se inocularon con células obtenidas de una placa de la levadura en medio agar papa
137 dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) incubada a 30°C, 24 h, recuperando las células y se
138 ajustaron en solución salina estéril a una cuenta celular de 5x10⁷ células/ml. Los matraces se
139 incubaron orbitalmente a 180 rpm a 30 °C, pH 5.5. Se tomaron muestras cada 12 h, para
140 realizar el conteo celular durante 48 h. El crecimiento celular se cuantificó

141 microscópicamente por duplicado en la cámara de Neubauer, diluyendo las muestras del
142 medio de cultivo en solución salina, seguida de una agitación vigorosa en orden de evitar la
143 sedimentación celular (Dinorín et al. 2015).

144 **Condiciones de cultivo a nivel reactor**

145 Las fermentaciones se realizaron en un reactor de 7-l BIOSTAT® A Plus (Sartorius), el medio
146 de cultivo tenía la siguiente composición en (g/l): 50, almidón de cebada; 8.6, NH₄Cl; 5,
147 extracto de levadura; 0.2, MgSO₄·7H₂O; 0.3, KH₂PO₄; 5, CaCO₃ y 0.001, Tiamina. Las
148 condiciones de operación del reactor fueron 4-l de medio, 30 °C, agitado a 600 rpm, 1.0 vvm
149 (volumen de aire por volumen de medio por minuto) y pH 5.5 controlado automáticamente
150 con ácido fosfórico e hidróxido de sodio. El inóculo del reactor (5% v/v) se preparó a partir
151 de una placa de PDA, inoculando 5x10⁵ células/ml a un matraz de 1-l con 200 ml de medio
152 líquido basado en almidón de cebada descrito anteriormente, incubando durante 18 h a 200
153 rpm, 30 °C. Se tomaron muestras cada 3 h para los análisis de crecimiento celular y
154 actividades enzimáticas.

155 **Obtención del extracto enzimático**

156 A las 30 h de fermentación se cosechó todo el cultivo y se centrifugó durante 15 min a 9240
157 g, y 4 °C para eliminar las células y el almidón residual. El sobrenadante se filtró con una
158 membrana de 0.45 µm y posteriormente ultrafiltrado, con una membrana de 50 kDa. El
159 extracto liofilizado (0.016 mBar, -52 °C), fue utilizado como fuente enzimática en ensayos
160 posteriores. La concentración de proteína en el extracto enzimático fue determinada por el
161 método de Lowry (1951) usando como referencia albúmina de suero bovino (BSA) para
162 generar la curva de calibración con un coeficiente de correlación de 0.9998.

163 **Análisis de actividad enzimática de *A. pullulans***

164 **Determinación de la actividad de glucoamilasa**

165 La actividad de glucoamilasa se realizó preparando una mezcla de reacción que contenía 1
166 ml de una solución de 10 g/l de almidón soluble en una solución amortiguadora de acetato
167 0.2 M pH 4.5 y 0.1 ml de extracto enzimático. Se incubó a 60 °C por 30 min, se centrifugó 7
168 min, 9240 g, y 4 °C. La concentración de glucosa se determinó en un analizador bioquímico
169 (YSI 2700 Select) basado en el método de la glucosa oxidasa. Una unidad de actividad de
170 glucoamilasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de
171 azúcares reductores (glucosa) por minuto bajo las condiciones de ensayo (Li et al. 2007a).

172 **Determinación de la actividad de α-amilasa**

173 El ensayo se realizó con una mezcla de reacción de 250 μl de solución amortiguadora de
174 acetato 0.2 mol/l, pH 4.5, 250 μl de *p*-nitrofenil-α-D-maltósido, 0.002 mol/l (Sigma
175 Aldrich®) y 50 μl de extracto enzimático. Se incubó durante 30 min a 70 °C; la reacción se
176 detuvo adicionando 1 ml de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 2 mol/l y el nitrofenol liberado se
177 midió por absorción a 410 nm. Una unidad α-amilasa fue definida como la concentración de
178 enzima que libera 1 μmol de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las
179 condiciones de ensayo (Silva 2005).

180 **Determinación de la actividad α-glucosidasa**

181 Se realizó con una mezcla de reacción de 250 μl de solución amortiguadora de acetato 0.2
182 mol/l, pH 4.0, 250 μl de *p*-nitrofenil α-D-glucopiranosido 0.005 mol/l (Sigma Aldrich®) y 50
183 μl de extracto enzimático. Después de incubar a 60 °C por 30 min, la reacción se detuvo
184 adicionando 1 ml de Na₂CO₃, 2 mol/l y el nitrofenol liberado se midió por absorción a 410
185 nm. Una unidad α-D-glucosidasa fue definida como la concentración de enzima que libera 1

186 μmol de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Saha
187 et al. 1993).

188 **Determinación de la actividad β -glucosidasa**

189 Para determinar dicha actividad se preparó una mezcla de reacción de 250 μl de solución
190 amortiguadora 0.2 mol/l, pH 4.5, 250 μl *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 0.004 mol/l
191 (Sigma Aldrich[®]) y 50 μl de extracto enzimático. Después de incubar a 60 °C por 30 min, la
192 reacción se detuvo adicionando 1 ml de Na_2CO_3 , 2 mol/l y el color fue medido a 410 nm.
193 Una unidad de β -glucosidasa fue definida como la concentración de enzima que libera 1 μmol
194 de nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Ribeiro et
195 al. 2007).

196 **Ensayos de sacarificación de almidón**

197 Para evaluar la actividad de las enzimas amilolíticas producidas por *A. pullulans*, se
198 realizaron ensayos de sacarificación usando almidón de cebada (AC) obtenido en este trabajo,
199 almidón soluble (AS) de papa (S2004, Sigmal-Adrich[®]) y almidón de maíz (AM) de
200 Ingredion S. A. de C. V. La mezcla de reacción consistió en 1 ml de solución de almidón y
201 100 μl de extracto enzimático con 0.84 mg/ml de proteína, incubándose 30 min, agitando a
202 200 rpm a 60 °C. Se centrifugó durante 10 min, 9240 g, y 4 °C. El extracto enzimático
203 liofilizado fue disuelto con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2 mol/L, pH de
204 4.5 y agua destilada. En todas las etapas del experimento se determinó la concentración de
205 glucosa mediante el analizador bioquímico YSI. Se usó el paquete estadístico Statgraphics
206 Plus y se estableció para todos los análisis la significancia $p < 0.05$. Se realizaron análisis de
207 varianza y comparaciones de rangos múltiples (Fisher) para elegir las condiciones más
208 adecuadas de hidrólisis.

209 Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: en la primera etapa se usó una
210 concentración de 10 g/l para los tres almidones aplicando tres tratamientos: usando como
211 disolvente un buffer de acetato 0.2 mol/l, pH 4.5 y agua destilada desionizada pH 7.0, el
212 primero se eligió debido a que se han reportado amilasas que tienen mayor actividad
213 enzimática en un rango de pH ácido; el agua para comparar la actividad a pH no controlado
214 y porque esta condición se usa a nivel industrial durante el proceso de sacarificación de
215 almidón (Bentley 1999). En otro tratamiento se observó el efecto del ion Ca^{2+} al adicionar
216 Ca_2Cl_2 (0.1 mol/l); se ha reportado que tiene un rol importante en la estabilidad estructural
217 y, por lo tanto, en la actividad enzimática y de muchas amilasas (Ghollasi et al. 2013).

218 Una vez seleccionadas las mejores condiciones de hidrólisis, en la segunda etapa se aplicó
219 un proceso de gelatinización para favorecerla, incubando el almidón a 100 °C, 200 rpm de
220 agitación, durante 90 min. Posteriormente se desarrolló la reacción de hidrólisis, se comparó
221 la concentración de glucosa obtenida al usar almidón gelatinizado y sin gelatinizar (Bentley
222 1999, Konsula et al, 2004).

223 En la tercera etapa, se aumentó la concentración de almidón a 50, 100, 200 y 400 g/l,
224 incubando a 30 min y 24 h, en las condiciones ya mencionadas, para determinar si aumenta
225 la concentración de glucosa producida; se ha reportado que es posible gelatinizar una
226 solución de almidón con 30-40 % de sólidos para posteriormente realizar la licuefacción
227 (Bentley 1999).

228 **Análisis de los productos de hidrólisis por cromatografía en capa fina**

229 Los productos de sacarificación del almidón fueron analizados por cromatografía en capa
230 fina (TLC por sus siglas en inglés); las mezclas de reacción de los diferentes experimentos

231 de sacarificación se centrifugaron 10 min, a 9240 g, y 4 °C; 1 µl de cada muestra se depositó
232 en una placa de silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). El sistema de elución se preparó con butanol-
233 etanol-agua-ácido acético (4:4:2:0.5 v/v/v/v), y se utilizó glucosa como estándar. Los
234 productos fueron revelados rociando la placa con ácido sulfúrico en metanol al 10 % (v/v) y
235 calentando a 100 °C en un horno hasta la aparición de manchas de revelado (“spots”) de color
236 café que indican la presencia de glucosa (Sarian et al. 2012).

237 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

238 **Aislamiento de almidón a partir de granos de cebada**

239 Para obtener el almidón a partir de los granos de cebada, se realizó una extracción por
240 molienda húmeda que implica la obtención de una suspensión (de color blanco) durante los
241 lavados. La suspensión de almidón centrifugada presentó dos fases: café en la parte superior
242 y blanca en la parte inferior. La fase café se debe al contenido de proteínas, fibra y gluten;
243 mientras que la fase blanca corresponde al almidón (Vasanthan y Hoover 2009). Éstas dos
244 fases se forman debido a la diferencia de densidades de gluten hidratado (1.1 g/ml) en
245 comparación con el almidón (1.5 g/ml) facilitando su separación al formar una pastilla. Los
246 rendimientos de la etapa de limpieza y de extracción del almidón se presentan en los **cuadros**
247 **I** y **II**, respectivamente. El rendimiento de 29 % de almidón del presente estudio es
248 comparable al reportado por Quintos et al. (2009), quienes obtuvieron 35.9 % y 30.2 % a
249 partir de la cebada variedad Esmeralda Apan perlada y sin perlar respectivamente; y de la
250 variedad Esmeralda Almoloya 33.8 % perlada y 28.4 % sin perlar. Por otro lado, se considera
251 moderado con respecto a Prieto et al. (2009) que reportaron 60 % de rendimiento con cebada
252 de buena calidad, utilizando cloruro de mercurio para favorecer la separación. Estos
253 resultados indican que al tratarse de cebada de baja calidad podría ser materia prima potencial
254 para obtener otros productos de interés.

255

Evaluación del crecimiento de *A. pullulans* a nivel matraz

256 Las cinéticas de crecimiento de *A. pullulans* se desarrollaron en cultivos a nivel matraz en
257 medio líquido ajustado a tres diferentes relaciones C:N, con el objetivo de generar biomasa.
258 En la **figura 1**, se observa el comportamiento cinético de *A. pullulans*, a las 12 h la densidad
259 celular para las relaciones C:N 20, 15 y 8 fue de 5.37×10^8 , 1.55×10^9 , 1.87×10^9
260 respectivamente, se observó que posteriormente el crecimiento celular disminuye.
261 Generalmente cuando se requiere propagar un cultivo a nivel reactor se debe de escoger la
262 condición donde se obtenga un mejor crecimiento (cuentas celulares) en un tiempo adecuado,
263 en nuestro caso la relación C:N de 8 a las 12 h cubre esta característica y es la que se utilizó
264 para el cultivo en reactor, se obtuvo con una concentración de 50 g/l de almidón de cebada y
265 8.6 g/l de NH_4Cl . Las relaciones de C:N 15 y 20 presentaron un 15 % y 71 % menor cantidad
266 de células a las 12 h.

267

Cultivo a nivel reactor de *A. pullulans*

268 La **figura 2**, muestra la cinética de crecimiento a nivel reactor, así como las diferentes
269 actividades enzimáticas; glucoamilasa, α -amilasa α -glucosidasa y β -glucosidasa. En el
270 **cuadro III** se presenta las actividades máximas alcanzadas en la fermentación. Al tratarse de
271 enzimas inducibles, se observó que su producción inicia desde las primeras horas de la
272 fermentación. Se aprecia una actividad importante glucoamilasa después de las 15 h, que se
273 incrementó conforme el tiempo de fermentación, mostrando la máxima actividad a las 15 h
274 con 193 U/ml. Li et al. (2007b) evaluaron *A. pullulans* N-13d con almidón soluble (10 g/l) y
275 reportaron una actividad máxima de 10 U/ml a las 32 h manteniéndose constante hasta las 72
276 h. Goyal et al. (2005) reportan con *Bacillus* sp. I-3 actividades de glucoamilasa de 90 U/ml

277 y 181 U/ml usando almidón soluble y almidón de maíz respectivamente, mientras que con
278 amilosa y amilopectina determinaron 0.34 U/ml y 0.47 U/ml respectivamente.

279 En cuanto a la producción de glucosidasas, la **figura 2** muestra que la producción de α -
280 glucosidasa coincide con el crecimiento de *A. pullulans*. La máxima producción fue de las
281 24 h a las 30 h (valor promedio de 8.1 U/ml) que coincide con la fase estacionaria. Hasta la
282 fecha solo el trabajo de Saha et al. (1993) reportaron la producción de una α -glucosidasa por
283 *A. pullulans* NRRL Y12974, obtuvo actividades de 2.14 U/ml, 0.77 U/ml y 1.59 U/ml en
284 almidón, amilosa y amilopectina respectivamente, todos a una concentración de 10 g/l.

285 La producción de β -glucosidasa coincidió con el crecimiento y mostró su actividad máxima
286 a las 24 h con 8.5 U/ml (**figura 2**). Este valor obtenido es mayor con respecto a lo reportado
287 por Saha et al. (1993), al evaluar *A. pullulans* NRRL Y12974 con salvado de maíz como
288 sustrato a 10 g/l, obtuvieron una actividad de 0.27 U/ml. Ribeiro et al. (2007) evaluaron *A.*
289 *pullulans* ER-16 usando salvado de trigo a 10 g/l, obtuvieron una actividad de 1.0 U/ml. Con
290 respecto a la producción y actividad de α -amilasa, en la misma figura se muestra un perfil
291 similar a las glucosidasas, donde a las 30 h presentó su mayor actividad con 7.4 U/ml. Solo
292 Saha y Bothast (1993) reportaron obtener una producción de α -amilasa por *A. pullulans*
293 NRRL Y12794 con 0.47 U/ml de actividad, pero en fermentación en sustrato sólido y 4 días
294 de proceso.

295 Por lo que la producción de enzimas amilolíticas por *A. pullulans* ATCC15233 al usar
296 almidón de cebada de baja calidad como sustrato es adecuada, debido a que la actividad de
297 estas enzimas fue superior a las que se han reportado hasta el momento para dicha levadura.
298 Cabe mencionar, la comparación se hace con diferentes cepas. Esto sugiere que el almidón

299 de cebada de baja calidad puede ser utilizado como sustrato potencial para la producción de
300 productos de valor agregado como las enzimas.

301 **Sacarificación enzimática de almidones de maíz, soluble y de cebada**

302 En la primera etapa, se usaron dos medios de reacción; un buffer de acetato 0.2 mol/l y agua
303 destilada sin la adición de Ca^{2+} y con la adición de Ca^{2+} en la mezcla de reacción (**fig. 3a**).
304 Para el almidón de cebada (AC), la sacarificación fue aparentemente mejor con el buffer de
305 acetato (efecto significativo, $p < 0.05$) y en presencia de Ca^{2+} , siendo la concentración máxima
306 de glucosa obtenida de 3.84 g/l. Para el caso del almidón soluble (AS) fue mejor la condición
307 de agua destilada Ca^{2+} , obteniendo 0.84 g/l de glucosa. Respecto a el almidón de maíz (AM),
308 se determinó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los cuatro tratamientos obteniéndose la
309 máxima concentración de glucosa de 0.4 g/l al usar agua y Ca^{2+} . En la **figura 3b**, se presenta
310 el análisis de TLC, donde se demuestra que el producto de reacción mayoritario fue glucosa
311 para cada fuente de almidón. Konsula et al. 2004 reportaron una α -amilasa producida por
312 *Bacillus subtilis* que aumentó su actividad relativa de 84.6 % a 96 % en presencia de Ca^{2+}
313 (0.8 mol/l) a 60 °C. En el presente trabajo la combinación del buffer de acetatos con Ca^{2+} fue
314 estadísticamente mejor. Sin embargo, se decidió usar agua y Ca^{2+} como medio de reacción
315 en los siguientes experimentos debido a que el agua es utilizada a nivel industrial durante el
316 proceso de sacarificación de almidón (Bentley 1999).

317 En la segunda etapa se utilizó la suspensión de almidón gelatinizado y sin gelatinizar a 10 g/l
318 (**fig. 4a**). Se observa que para almidón de cebada el porcentaje de hidrólisis no se favorece
319 con el almidón gelatinizado y se determinó que no existe diferencia significativa,
320 obteniéndose 3.25 g/l y 3.1 g/l de glucosa para almidón gelatinizado y sin gelatinizar
321 respectivamente. En la **figura 4b** se corrobora que la glucosa es el producto principal de

322 hidrólisis. Respecto al almidón soluble, se produjeron 2.97 g/l y 0.6 g/l de glucosa usando
323 almidón gelatinizado y sin gelatinizar respectivamente, lo cual representa una hidrólisis
324 mayor con una diferencia significativa ($p < 0.05$) al gelatinizar el almidón soluble.

325 Finalmente, para el almidón de maíz se produjeron 2.6 y 0.23 g/l a partir de almidón
326 gelatinizado y sin gelatinizar respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento de
327 gelatinización favoreció la hidrólisis de AS y AM incrementado su susceptibilidad a la
328 degradación enzimática en comparación a sus formas nativas, es decir sin gelatinizar lo cual
329 es congruente con reportes previos (O'Brien y Wang, 2008). Por ejemplo, al gelatinizar
330 almidón de papa y de arroz, se aumentó la concentración de azúcares reductores liberados de
331 17 mg/ml a 29 mg/ml y de 14 mg/ml a 24 mg/ml, respectivamente (Konsula et al. 2004).

332 En la tercera etapa se aumentó la concentración de los diferentes almidones a 50, 100, 200 y
333 400 g/l, adicionando Ca^{2+} , aplicando un proceso de gelatinizado (**fig. 5**). Los resultados
334 demuestran que, para almidón de cebada, la mejor condición se obtuvo a 30 min de reacción
335 y 50 g/l con 8.71 % de hidrólisis, siendo menor con 100 g/l (6.51 %), 200 g/l (6.75 %) y 400
336 g/l (5.98 %). Al evaluar el tiempo de reacción de 24 h, la hidrólisis no es favorecida de manera
337 importante, siendo solo el aumento de 3.29, 1.62, 0.42 y 0.26 % para 50, 100, 200 y 400 g/l,
338 respectivamente (**fig. 5b**).

339 Para almidón soluble a 30 min de reacción a 50 g/l se obtuvo 7.32 % de hidrólisis, y conforme
340 se aumentó la concentración la hidrólisis disminuyó siendo 4.09 % (100 g/l), 2.46 % (200
341 g/l) y 1.89 % (400 g/l) (**fig. 5a**). Sin embargo, cuando el tiempo de reacción fue de 24 h, la
342 hidrólisis se incrementó en 47.9, 27.9, 13.9 y 7.0 % para 50, 100, 200 y 400 g/l
343 respectivamente (**fig. 5b**).

344 Con respecto al almidón de maíz, a 30 min de reacción se obtuvieron los siguientes
345 porcentajes de hidrólisis: 6.0, 3.7, 3.4 y 1.9 % con 50, 100, 200 y 400 g/l respectivamente
346 (**fig. 5a**). A las 24 h, la hidrólisis tuvo un efecto significativo positivo, aumentando 42, 21.7,
347 12.4 y 6.0 % para 50, 100, 200 y 400 g/l respectivamente (**fig. 5b**). El gránulo de almidón de
348 maíz presenta una estructura más compleja comparada con el almidón de cebada y el almidón
349 soluble proveniente de papa (Naguleswaran et al. 2013), por lo que se requiere de mayor
350 tiempo de reacción para favorecerla hidrolisis como se observó en este ensayo. El análisis
351 por TLC indicó que la glucosa es el producto principal de hidrólisis (**fig. 6**).

352 En general, para los tres almidones cuando se aumentó de 10 g/l a 50 g/l, aumentó la
353 hidrólisis. Sin embargo, para concentraciones superiores a 100 g/l no se observó efecto, lo
354 que sugiere que la viscosidad es más alta al aumentar la concentración del almidón
355 gelatinizado, ocasionando que la velocidad de agitación no fue suficiente para favorecer el
356 mezclado y la interacción entre la enzima y el sustrato. Además, es posible que se haya
357 producido inhibición por sustrato; observaciones similares se reportaron para almidón de
358 yuca (Ruiz et al. 2011). Cabe mencionar, la hidrólisis entre los almidones, depende
359 principalmente de la diferencia estructural que tiene cada uno (relación amilosa-
360 amilopectina), haciéndolos más o menos susceptibles a las enzimas (Naguleswaran et al.
361 2012).

362 Las enzimas amilolíticas producidas por *A. pullulans* presentan ventajas debido a que
363 hidrolizan almidón a 60 °C, temperatura menor a las reportadas en procesos de sacarificación
364 (90 °C; Bentley 1999) y se obtiene glucosa como principal producto de reacción. Además, al
365 ser un extracto crudo (es decir, sin aplicar algún método de purificación), la sacarificación se
366 puede realizar en una etapa. En comparación con los procesos industriales, en los cuales

367 después de las etapas de gelatinización y licuefacción del almidón, la sacarificación es
368 realizada en dos fases con enzimas purificadas y en secuencia, primero una α -amilasa (1^a
369 fase, principal producto de reacción: dextrinas, oligómeros) y posteriormente glucoamilasas
370 (2 fase, principal producto de reacción: glucosa) (Van der Maarel et al. 2002). Por lo que
371 utilizar extractos de amilasas de *A. pullulans* podría disminuir el tiempo y costo de los
372 procesos de sacarificación.

373 CONCLUSIONES

374 Considerando los resultados anteriores, aquellas cosechas de cultivos como la cebada, que
375 no cumplen los requisitos para la alimentación del ganado y la industria alimentaria puede
376 ser considerada como materia prima de bajo costo para la obtención de productos de valor
377 agregado como enzimas amilolíticas.

378 En el presente trabajo el almidón de cebada de baja calidad fue aprovechado como materia
379 prima para la producción de enzimas amilolíticas: glucoamilasa, α -glucosidasa, β -
380 glucosidasa y α -amilasa por *A. pullulans* y presentaron la capacidad de hidrolizar almidón de
381 cebada, almidón soluble y almidón de maíz en condiciones que se aplican en procesos
382 industriales en la sacarificación.

383 REFERENCIAS

- 384 Aguilar J. y Schwentesius R. (2004). La producción de cebada Maltera en México,
385 ventaja comparativa no capitalizada, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de
386 Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la
387 Agricultura Mundial (CIESTAAM).
- 388 Bentley I.S. (1999). Enzymes, Starch Conversion. En: The encyclopedia of bioprocess
389 technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation (Flickinger M. C. y Drew
390 S.W. Ed), John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 1104-1112.

391 Botella C., Ory I., Webb C., Cantero D. y Blandino A. (2005). Hydrolytic enzyme
392 production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26 (2-3),
393 100-106. DOI: 10.1016/j.bej.2005.04.020

394 Castilho L.R., Medronho R.A. y Alves T.L.M. (2000). Production and extraction of
395 pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with
396 *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 71 (1), 45-50.

397 Demirkan E.S., Mikami B., Adachi M., Higasa T. y Utsumi S. (2005). α -Amylase from
398 *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and
399 expression in *E. coli*. *Process Biochem.* (40), 2629-2636. DOI:
400 10.1016/j.procbio.2004.08.015

401 Dinorín J., Delgado R., Larralde P., Martínez F., de la Torre M., López V. E. (2015).
402 Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process
403 in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. *Appl Microbiol*
404 *Biotechnol* (99), 5439 -5450. DOI 10.1007/s00253-015-6562-9

405 Djekrif D.S., Gillmann L., Bennamoun L., Ait-Kaki A., Labbani K., Nouadri T. y Meraihi
406 Z. (2015). Amylolytic Yeasts: Producers of α -amylase and Pullulanase. *Int. J. Life.*
407 *Sci. Scienti. Res.* 2(4), 339-354. DOI: 10.21276/ijlssr.2016.2.4.6

408 FAO (2016). Food and Agriculture Organization [en línea]. <http://www.fao.org/>

409 Ghollasi M., Ghanbari-Safarib M. y Khajeh K. (2013). Improvement of thermal stability
410 of a mutagenised α -amylase by manipulation of the calcium-binding site. *Enzyme*
411 *Microb. Technol.* (53), 406-413. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.09.001

412 Godoy M.G., Gutarra M.L.E., Maciel F.M., Felix S.P., Bevilaqua J.V., Machado O.L.T.
413 y Freire D.M.G. (2009). Use of a low-cost methodology for biodetoxification of
414 castor bean waste and lipase production. *Enzyme Microb. Technol.* 44 (5), 317-
415 322. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.01.002

416 Goyal N., Gupta K.J. y Soni K.S. (2005). A novel raw digesting thermostable α -amylase
417 from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch.
418 Enzyme Microb. Technol. (37), 723-734. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.04.017

419 Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K. y Chauhan B. (2003) Microbial α -
420 amylases: biotechnological perspective. Process Biochem. (38), 1599-1616. DOI:
421 10.1016/S0032-9592(03)00053-0

422 Hayashi S., Sako S., Yokoi H., Takasaki Y. e Imada K. (1999). Purification and
423 characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC
424 20524. J. Ind. Microb. Biotechnol. (22), 160-163.

425 Konsula Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of
426 an α -amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochem. (39), 1745-1749. DOI:
427 10.1016/j.procbio.2003.07.003

428 Li H., Chi Z., Duan X., Wang L., Sheng J. y Wu L. (2007a). Glucoamylase production
429 by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch
430 granules by the enzyme. Process Biochem. (42), 462-465.
431 DOI.10.1016/j.procbio.2006.09.012

432 Li H., Chi Z., Wang X., Duan X. y Gao L. (2007b). Purification and characterization of
433 extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its
434 raw potato starch digestion. Enzyme Microb. Technol. (40), 1006–1012. DOI:
435 10.1016/j.enzmictec.2006.07.036

436 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951.) Protein measurement
437 with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1 (93), 267–275.

438 Naguleswaran S., Li J., Vasanthan T., Bressler D. y Hoover R. (2012). Amylolysis of
439 large and small granules of native triticale, wheat and corn starches using a mixture
440 of α -amylase and glucoamylase. Carbohy. Polym. (88), 864-874. DOI:
441 10.1016/j.carbpol.2012.01.027

442 Naguleswaran S., Vasanthan T., Hoover R. y Bressler D. (2013). The susceptibility of
443 large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley
444 and corn starches toward amylolysis at sub-gelatinization temperatures. Food Res.
445 Int. (51), 771-782. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.057

446 O'Brien S. y Wang Y.J. (2008). Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -
447 amylase and glucoamylase. Carbohy. Polym. (72), 597-607. DOI:
448 10.1016/j.carbpol.2007.09.032

449 Oliveira L.A., Porto A.L.F. y Tambourgi E.B. (2006). Production of xylanase and
450 protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural
451 wastes. Bioresour. Technol. 97 (6), 862-867. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.04.017

452 Prieto M.J., Rubio H.C.U., Román G.A.D., Méndez M.M.A., González R.C.A. y Prieto
453 G.F. (2009). Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess).
454 Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. Multiciencias. 9 (2),
455 115-125.

456 Quintos G.J., Delgadillo D.M., Prieto G.F. y Román G.A.D. (2009). Aislamiento y
457 caracterización de almidón de cebada (*Hordeum vulgare*) de la variedad esmeralda
458 de los municipios de Apan y Almoloya Hidalgo, "Memorias". XI Congreso
459 Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos. Monterrey, Nuevo León. 31 de
460 Agosto y 1 de Septiembre. CD-ROM

461 Rana N., Walia A. y Gaur A. (2013) α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential
462 Applications in Various Industries. Natl. Acad. Sci. Lett. 36 (1), 9-17. DOI:
463 10.1007/s40009-012-0104-0

464 Ribeiro L.R.S., Ferreira A.P.H., Cabral H., Pagnocca F.C., Gomes E. y Da Silva R.
465 (2007). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases
466 produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans*
467 in agricultural wastes. Enzyme Microb. Technol. (43), 391-395. DOI:
468 10.1016/j.enzmictec.2008.07.006

469 Ruiz M.I., Sanchez C.I., Torres R.G. y Molina D.R. (2011). Enzymatic hydrolysis of
470 cassava starch for production of bioethanol with a Colombian wild yeast strain. J.
471 Braz. Chem. Soc. 22 (12), 2337-2343

472 Saha B.C., Silman W. R. y Bothast J. R. (1993). Amylolytic Enzymes produced by a
473 color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Curr. Microbiol. (26), 267-273.

474 Saha B.C. y Bothast R. J. (1993). Starch conversion by amylases from *Aureobasidium*
475 *pullulans*. J. Ind Microbiol. (12), 413-416.

476 Sarian F.D., van der Kaaij R.M., Kralj S., Wijbenga D. J., Binnema D.J. y van der Maarel
477 M.J. (2012). Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium*
478 *aurum* strain B8 A. Appl. Microbiol. Biotechnol. (93), 645-654. DOI:
479 10.1007/s00253-011-3436-7

480 Sauer J., Sigurskjold B.W., Christensen U., Frandsen T.P., Mirgorodskaya E., Harrison
481 M., Roepstor P. y Svensson B. (2000). Glucoamylase: structure/function
482 relationships, and protein engineering. Biochim. Biophys. Acta (1543), 275-293.

483 Secretaria de Economía (2003). Norma Mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003. Productos
484 alimenticios no industrializados para consumo humano-cereal-cebada maltera-
485 (*Hordeum vulgare* L. y *Hordeum distichum* L.)-Especificaciones y métodos de
486 prueba. Diario Oficial de la Federación. 6 de noviembre de 2003.

487 Serna S.S.R. (2001). Química de almacenamiento e industrialización de los cereales,
488 AGT. Editor, Segunda Edición, México, D. F.

489 Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2016. [en línea]
490 <https://www.gob.mx/siap>

491 Silva M.T., Angelis D.A., Carvalho A.A.F., Da Silva R., Boscolo M. y Gomes E. (2005).
492 Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylase by *Rhizomucor pusillus*
493 A 13.36. J. Microbiol. (43), 561-568.

- 494 Suvarna L.G., Subba R.C., Sreenivas R.R., Hobbs P.J. y Shetty P.R. (2009). Enhanced
495 production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state
496 fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochem. Eng.*
497 *J.* (48), 51-57. DOI: 10.1016/j.bej.2009.08.005
- 498 Tomasik P. y Horton D. (2012). Enzymatic conversions of starch. En: *Advances in*
499 *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier Inc. (68), 59-436. DOI:
500 10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4
- 501 Uthumporn U., Shariffa Y.N., Failah A. y Karim A.A. (2012). Effects of NaOH treatment
502 of cereal starch granules on the extent of granular starch hydrolysis. *Colloid Polym.*
503 *Sci.* (290), 1481-1491. DOI: 10.1007/s00396-012-2674-2
- 504 Van der Maarel M.J.E.C., Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. y Dijkhuizen
505 L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -
506 amylase family. *J. Biotechnol.* (94), 137-155. DOI: S0168-1656(01)00407-2
- 507 Vasanthan T., Hoover R. (2009). *Barley Starch: Production, Properties, Modification and*
508 *Uses*. En: *Starch: Chemistry and Technology*. BeMiller J. and Whistler R. (editors).
509 Third Edition, Elsevier Inc.
- 510 Wang L. y Wang Y.J. (2004). Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity
511 ultrasound. *J. Cereal Sci.* (39), 291-296. DOI: 10.1016/j.jcs.2003.11.002

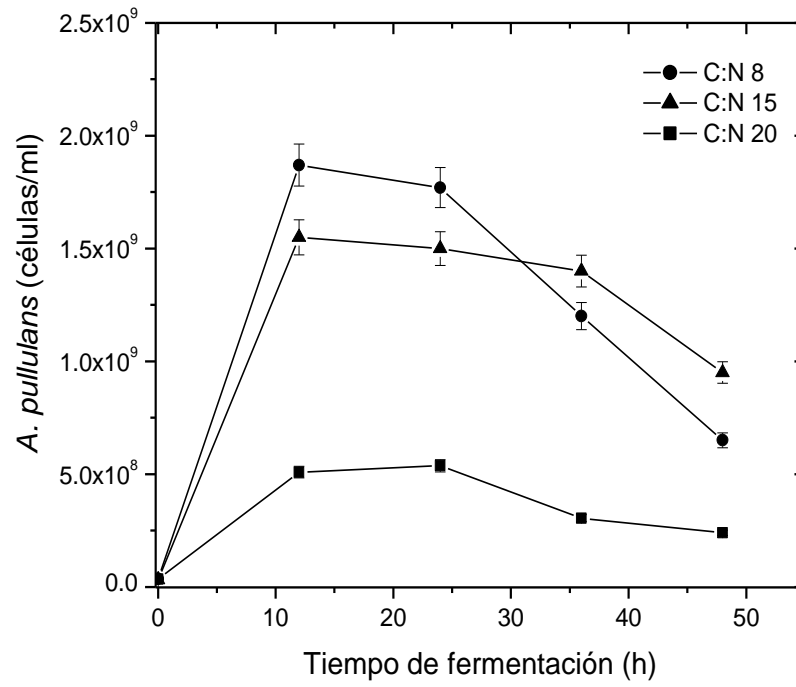


Fig. 1. Crecimiento de *A. pullulans* a nivel matraz a C:N de 8, 15 y 20.

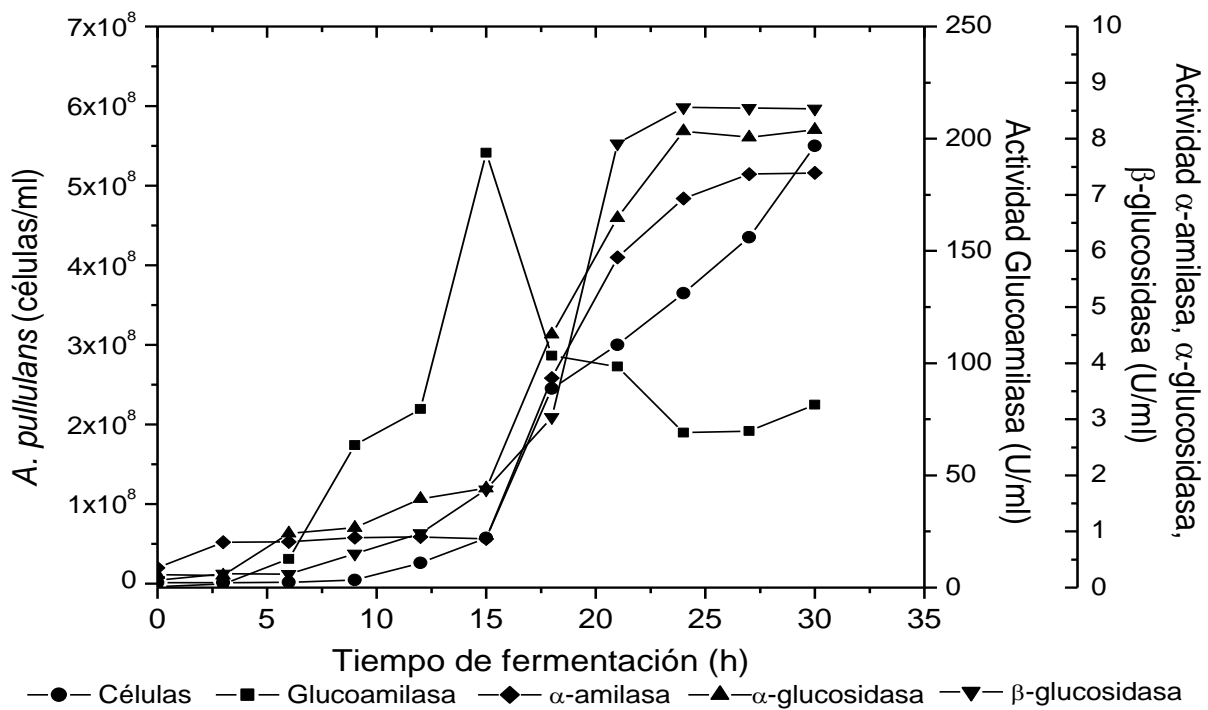
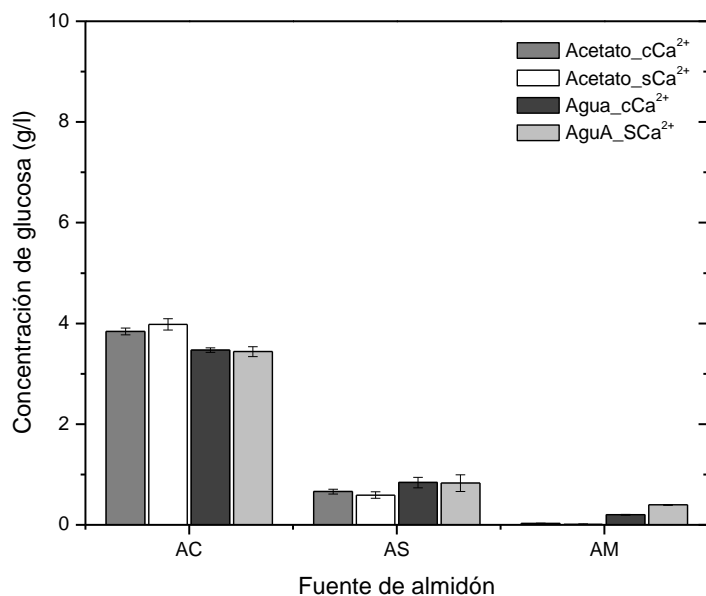


Fig. 2. Cinética de crecimiento de *A. pullulans* ATCC15233 y actividad enzimática de glucoamilasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y α -amilasa en cultivos en lote a nivel reactor.

(a)



(b)



Fig. 3. Hidrólisis enzimática de almidón de diferentes fuentes (10 g/l); (a) almidón de cebada (AC), almidón soluble (AS) y almidón de maíz (AM), usando agua y amortiguador de acetato (pH 4.5), con y sin adición de Ca²⁺. (b) Análisis de los productos por TLC, M: marcador (Glucosa).

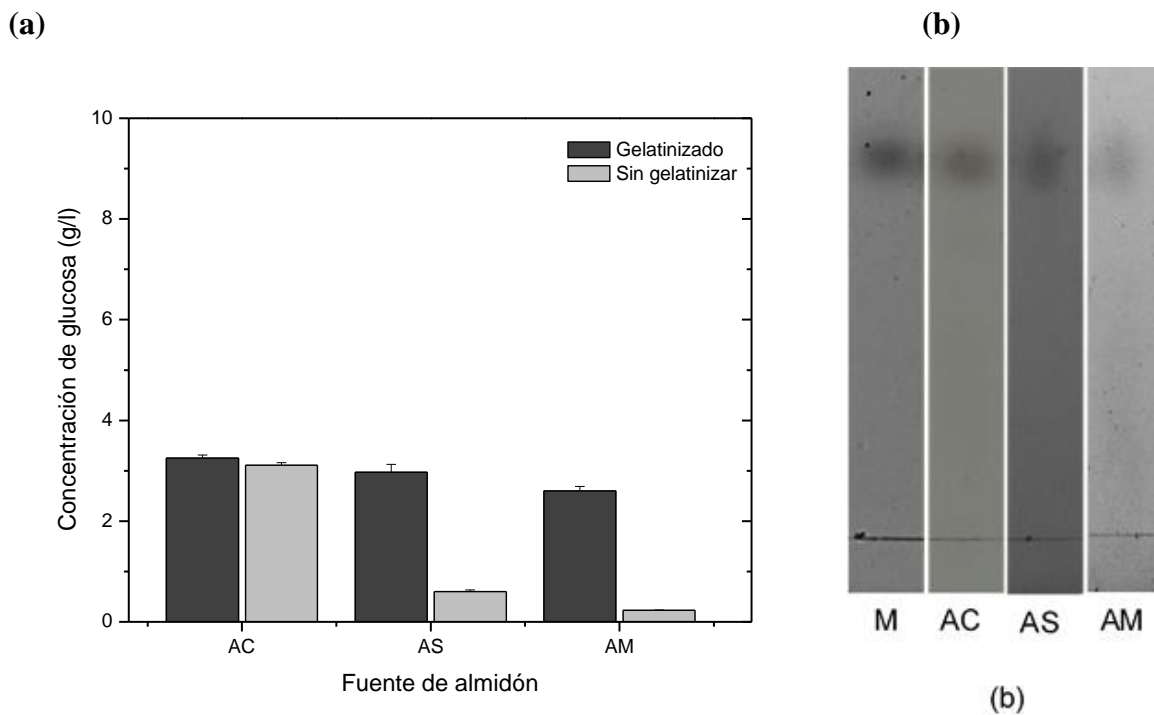
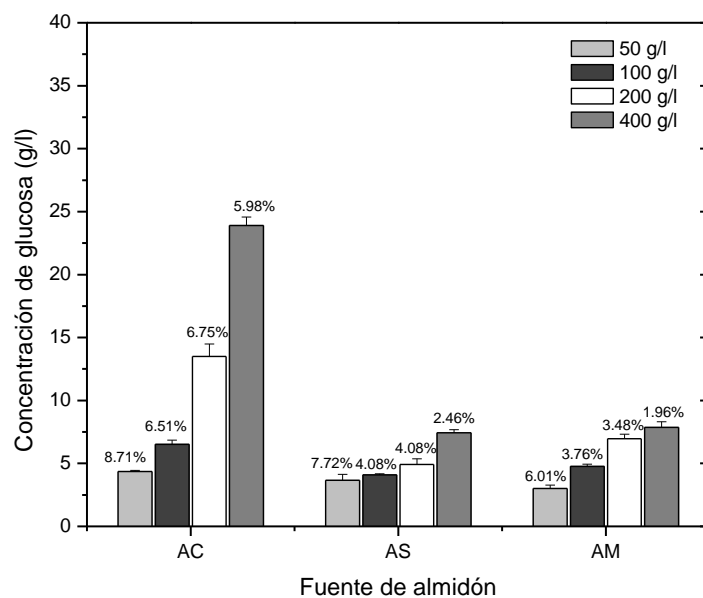


Fig. 4. Hidrólisis enzimática de almidón de diferentes fuentes (10 g/l). (a) Almidón de cebada (AC), almidón soluble (AS) y almidón de maíz (AM), en un sistema acuoso, usando almidón gelatinizado y sin gelatinizar, con adición de Ca^{2+} . (b) Análisis de los productos por TLC, M: marcador (Glucosa).

(a)



(b)

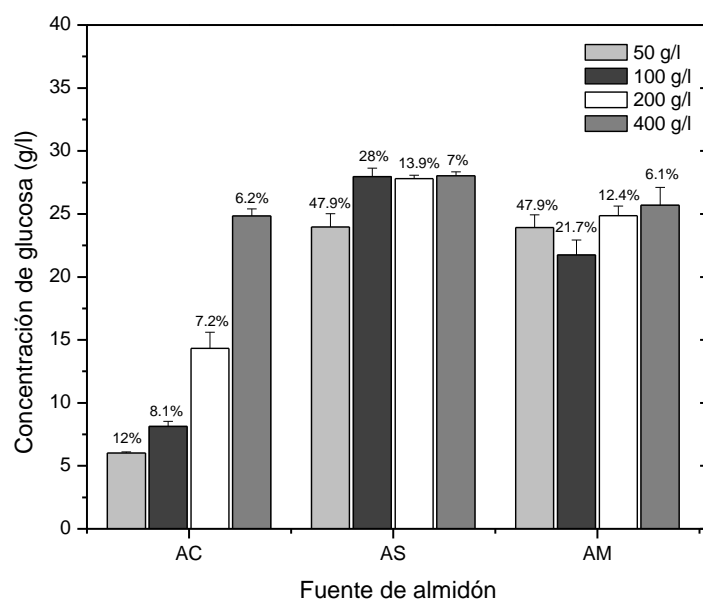


Fig. 5. Hidrólisis enzimática de almidón; almidón de cebada (AC), almidón soluble (AS) y almidón de maíz (AM), en un sistema acuoso, usando almidón gelatinizado en diferentes concentraciones, con Ca^{2+} . La reacción se realizó durante 30 min (a) y 24 h (b). Se indican los porcentajes de hidrólisis para cada fuente de almidón.

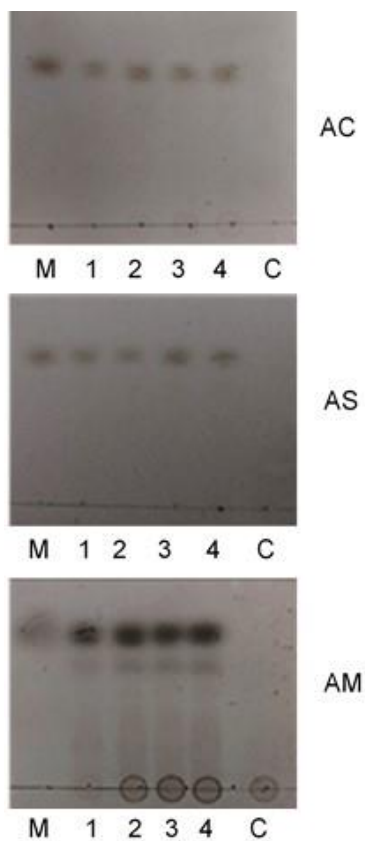


Fig. 6. Análisis de los productos de hidrólisis por TLC, almidón de cebada (AC), almidón soluble de papa (AS) y almidón de maíz (AM), a 24 h a diferentes concentraciones, M: marcador (Glucosa), 1: 50, 2:100, 3: 200 y 4: 400 g/l, C: control.

CUADRO I. RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA ETAPA DE LIMPIEZA A PARTIR DE CEBADA

Peso inicial (kg)	Peso grano (kg)	Rendimiento (%)	Peso grano (kg)	Peso harina (kg)	Rendimiento (%)	Rendimiento total (%)
2.5	2.08	83.2	2.080	2.065	99	84

CUADRO II. RENDIMIENTOS DE ALMIDÓN OBTENIDOS EN LA FASE DE EXTRACCIÓN A PARTIR DE CEBADA

Peso harina (kg)	Peso almidón (kg)	Peso pigmentos (kg)	Rendimiento de almidón (%)
2.08	0.6	0.598	29

CUADRO III. ACTIVIDADES MÁXIMAS DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS DE PRODUCIDAS POR *Aureobasidium pullulans*

Enzimas	Actividad enzimática (U/ml)	Tiempo de fermentación (h)
Glucoamilasa	193	15
α -glucosidasa	8.1	24-30
β -glucosidasa	8.5	24
α -amilasa	7.4	30