

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

FUNCIONALIDAD DE DOS Y TRES DOMINIOS
DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN INSOLUBLE DE LA
 α -AMILASA DE *Lactobacillus amylovorus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DANIEL ALEJANDRO GUILLÉN SANTOS



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

2005

m348998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. José Guillermo De J. Aguilar Osorio.
Vocal Prof. Martha Giles Gómez.
Secretario Prof. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja.
1er. Suplente Prof. Ma. Eugenia De La Torre Hernández.
2do. Suplente Prof. Beatriz Ruiz Villafán.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Microbiología Industrial. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.



Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Tutor



Daniel Alejandro Guillén Santos
Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recapital.

NOMBRE: Daniel Guillén Santos

FECHA: 14/ Octubre / 2005

FIRMA: _____

Agradecimientos:

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por compartir sus conocimientos así como por su asesoría y paciencia durante la realización de este trabajo.

Mi gratitud a la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán y a la Dra. Norma A. Oviedo De Anda por la ayuda recibida y por las valiosas discusiones.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su hospitalidad durante el tiempo que pase en el laboratorio.

Con cariño a mis padres Carlos y Carmen, este pequeño éxito en mi vida es posible gracias a su dedicación y gran amor.

A Karina, gracias por brindarme una parte de tu vida y recorrer el camino a mi lado acompañándome en sueños, penas y alegrías.

Gracias a Monserrat Santiago, Susana González y Larissa Linares por compartir experiencias pero más importante por su amistad.

Al CONACyT por la beca recibida y el financiamiento al proyecto J-41222-Z.

Lista de abreviaciones utilizadas:

amyA: gen de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

amyA: α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

DFA: Dominio de Fijación al almidón.

DFC: Dominio de Fijación a Carbohidrato.

GH: Glucósido Hidrolasa.

Kad: Constante de Adsorción.

MUC: Módulo de Unión a Carbohidrato.

UR: Unidad Repetida.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	5
Antecedentes.....	6
El almidón.....	6
Las α -amilasas.....	10
Clasificación de las α -amilasas.....	11
Mecanismo de acción.....	13
Regiones conservadas.....	15
Función de los Dominios de Fijación a Carbohidratos.....	17
Amilasas en la Industria.....	19
Bacterias Lácticas amilolíticas.....	20
Objetivos.....	24
Hipótesis.....	24
Material y Método.....	25
Resultados.....	31
Discusión.....	43
Conclusiones.....	47
Referencias.....	48
Apéndices.....	52

RESUMEN:

Las α -amilasa perteneciente a *Lactobacillus amylovorus* es una enzima multidominio que presenta en el extremo C-terminal un dominio de fijación al almidón (DFA). Este DFA, presenta una característica inusual para las α -amilasas, ya que se encuentra constituido por cinco unidades repetidas, directas e idénticas (UR), donde cada unidad es aproximadamente del tamaño que corresponde a los DFA reportados para otras amilasas.

En el caso de la α -amilasa de *L. amylovorus* se sabe que el DFA por si solo, así como una UR, son capaces de adsorberse al almidón insoluble pero con diferentes constantes de adsorción (K_{ad}) ya que la de cinco UR es mucho mayor que la de una UR e incluso que la amilasa entera.

Con la finalidad de ayudar a esclarecer la importancia de las UR en el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* así como contribuir a dilucidar la forma en que actúan estas UR, en este trabajo se clonaron y expresaron de manera heteróloga las proteínas correspondientes a dos y tres UR y posteriormente se analizó su capacidad de adsorción sobre el almidón insoluble.

Los resultados demostraron que dos UR presentan una K_{ad} muy similar a la de la α -amilasa completa, lo que sugirió que probablemente sean solo dos UR las que utiliza la α -amilasa para adsorberse al gránulo de almidón, por otra parte tres UR presentaron una K_{ad} mayor que dos UR pero menor que cinco UR, lo cual denotó la importancia del número de UR presentes para llevar a cabo el fenómeno de adsorción y sugirió un probable efecto cooperativo por parte de las UR.

INTRODUCCIÓN

El almidón es el principal polisacárido de reserva de las plantas y debido a su abundancia una gran variedad de microorganismos lo aprovechan como fuente energética, para ello, cuentan con diferentes clases de enzimas que son capaces de hidrolizarlo.

Entre las enzimas con capacidad amilolítica se encuentran pululanasas, α -glucosidasas, isoamilasas, β -amilasas, ciclodextringlucosil-transferasas, glucoamilasas y α -amilasas, siendo estas dos últimas las de mayor aplicación a nivel industrial. [1].

Las enzimas amilolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas, hongos y bacterias, por ejemplo, se han aislado bacterias lácticas con capacidad amilolítica, la cual es una actividad inusual en este tipo de bacterias debido a que generalmente se encuentran en cavidades animales e intestinos, en superficies de plantas y en material vegetal y animal en descomposición. Entre las bacterias lácticas con actividad amilolítica aisladas a partir de productos fermentados de arroz, manioca, mijo, sorgo, trigo y de algunas otras fermentaciones vegetales tradicionales se encuentran *L. cellobiosus* [2], *L. fermentum* [3], *L. amylophilus* [4], *L. amylolyticus* [5], *L. plantarum* [6], *L. amylovorus* [7] y *L. manihotivorans* [8].

Estas bacterias producen α -amilasas, las cuales son enzimas multidominios que catalizan la hidrólisis de los enlaces alfa-D-(1,4)-glucosídicos del almidón mediante un mecanismo de retención de la configuración conocido como catálisis ácida, el resultado de la hidrólisis son oligosacáridos de longitud variable. Las α -amilasas comparten una estructura de barril- $(\beta/\alpha)_8$ en el dominio catalítico y pueden o no llegar a tener un dominio de fijación al almidón insoluble (DFA), ya que, solo el 10% de amilasas de origen microbiano lo presentan [9].

Los genes que codifican las α -amilasas de *L. manihotivorans*, *L. plantarum* y *L. amylovorus* fueron secuenciados [10,11]. El análisis de la secuencia permite identificar dos partes en el gen: i) Del extremo 5' al sitio *Bam*HI (nucléotidos 1-1422 en la α -amilasa de

L. amylovorus) se codifica el dominio catalítico y ii) Del sitio *Bam*HI al extremo 3' (nucleótidos 1423-2857 en la α -amilasa de *L. amylovorus*) se encuentra una estructura diferente a la reportada para el resto de las amilasas, debido a la presencia de secuencias repetidas, directas e idénticas de 273 nucleótidos cada una; cuatro secuencias son observadas en el caso de las α -amilasas de *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, mientras que para la α -amilasa de *L. amylovorus* (amy A) se observan cinco secuencias repetidas [11]. La presencia de estas secuencias o unidades repetidas (UR) da como resultado una amilasa con un peso aproximado de 100 kDa, mientras que el resto de las amilasas reportadas tienen una talla entre 50-60 kDa [12].

Utilizando como modelo la α -amilasa de *L. amylovorus* se ha comprobado que estas UR forman el DFA, ya que, por un lado al truncarse las UR, la amilasa pierde su capacidad de adsorberse al gránulo de almidón insoluble y por tanto de hidrolizarlo [13], mientras que por otro lado las cinco UR expresadas sin dominio catalítico se adsorben fuertemente al gránulo de almidón [14]. Esto resulta interesante ya que de manera usual en las amilasas, el DFA está formado de cien a ciento cincuenta aminoácidos dependiendo del origen de la enzima [12], mientras que las cinco UR que conforman al DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus*, están formadas cada una por noventa y un aminoácidos.

La forma en que interactúan las cinco UR como unidad o en partes para llevar a cabo la adsorción al gránulo de almidón y la manera en que afecta su presencia al dominio catalítico no se encuentra totalmente esclarecido. Con el objeto de entender si una sola unidad aislada podía tener la función de fijación, se clonaron una de las UR y las cinco que forman el DFA, para después determinar su capacidad de adsorción sobre su sustrato insoluble. Los resultados demostraron que el péptido de una UR es capaz de adsorberse al gránulo, pero en menor medida que las cinco, que se adsorben incluso más que la α -amilasa completa [14].

Es necesario pues, para ayudar a esclarecer el fenómeno de adsorción, así como la importancia del número de UR presentes, estudiar la capacidad de unión de un número intermedio de UR pertenecientes al DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus*, por lo que en

este trabajo se pretende contribuir a la caracterización del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* analizando la adsorción al almidón insoluble de dos y tres unidades repetidas aisladas.

JUSTIFICACIÓN:

Hasta el momento no se ha descrito la funcionalidad de un dominio de fijación a carbohidrato con las características del DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* por lo que este trabajo contribuirá en lo general al estudio de las amilasas de bacterias lácticas y en lo particular a la descripción funcional de este nuevo tipo de dominio de fijación al almidón, tema del cual no hay mucho descrito. Por otro lado este estudio puede incidir en la aplicación de dicho DFA al sentar las bases para la elaboración de vectores de expresión que puedan utilizar este dominio de fijación como tallo para la purificación de proteínas recombinantes, así como en la industria de la transformación del almidón.

ANTECEDENTES:

1. Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en las plantas, estas lo almacenan en tubérculos (papas, yuca), legumbres (garbanzo) y cereales (maíz). Sin embargo, no sólo es una importante reserva para las plantas, también los humanos obtienen gran parte de su energía al consumirlo en los alimentos. El almidón se diferencia de otros polisacáridos presentes en la naturaleza en que se arregla como un conjunto de partículas o gránulos, que se encuentran localizados en organelos llamados amiloplastos. Estos gránulos tienen un tamaño que va de 2 a 30 μm en el almidón de maíz hasta 5 a 100 μm en el almidón de papa; son relativamente densos e insolubles en agua fría, aunque pueden dar lugar a suspensiones cuando se dispersan en el agua [15].

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

En el almidón se encuentran presentes dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina (Fig.1). La amilosa es un polímero lineal que presenta un arreglo helicoidal en el espacio y consiste en más de 6000 unidades de glucosa enlazadas mediante uniones glucosídicas α -1,4. El número de residuos de glucosa es indicado mediante el término GP (grado de polimerización) y varía respecto al origen del almidón. La amilosa proveniente de tapioca o papa tiene un GP de 1000-6000 mientras que la amilosa de maíz o de trigo tiene un GP entre 200 y 1200. El contenido típico de amilosa es de 20 a 25% y no es esencial en la formación del gránulo [15, 16].

Por otro lado la amilopectina consiste de cadenas lineales de aproximadamente 10 a 60 unidades de glucosa, unidas por enlaces α -1,4 y cadenas laterales de 15-45 residuos de glucosa unidas mediante enlaces α -1,6. El número promedio de puntos de ramificación en la amilopectina es de 5%, pero varía con respecto al origen botánico. La molécula completa

de amilopectina contiene aproximadamente 2 000 000 unidades de glucosa, lo que la convierte en una de las mas largas en la naturaleza [15].

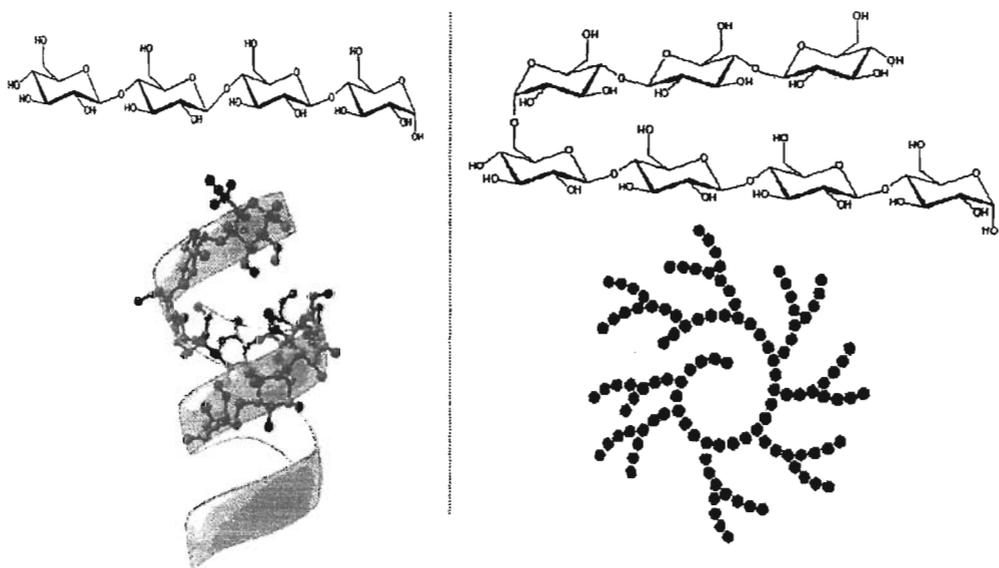
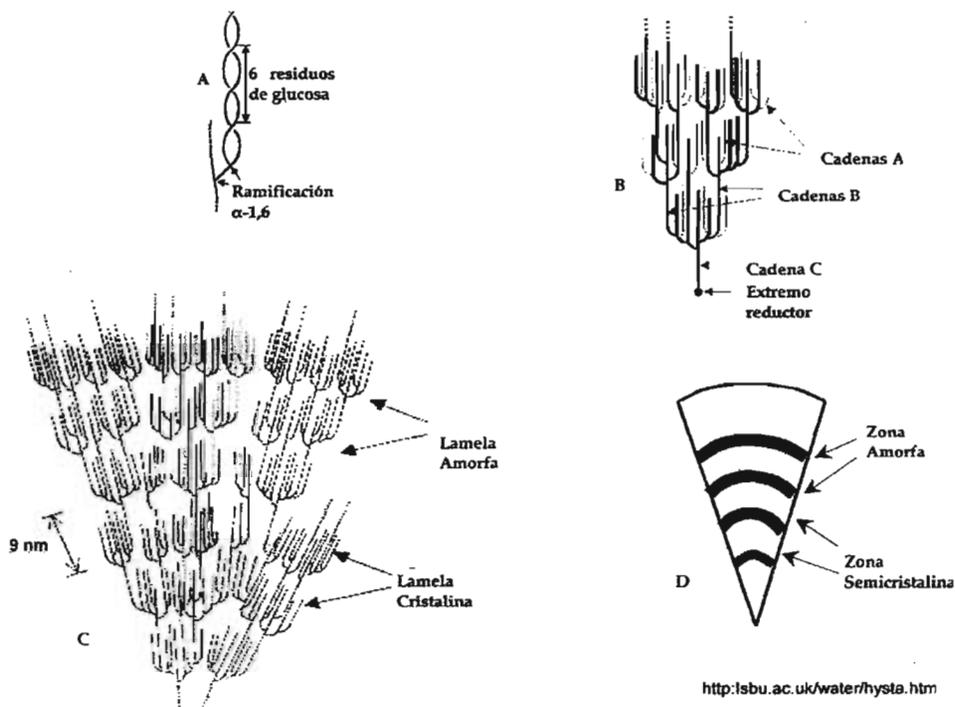


Fig. 1: Representación de los dos polimeros de glucosa que se encuentran en el almidón. A) La amilosa con enlaces α -1,4 y B) la amilopectina con enlaces α -1,4 y ramificaciones unidas a través de enlaces α -1,6.

El modelo comúnmente aceptado para la amilopectina es el modelo de cluster, en el cual las cadenas de glucosa se arreglan de manera radial en el gránulo, con los extremos no reductores apuntando hacia la superficie, organizadas de manera alternada en lamelas cristalinas y amorfas, con una periodicidad de 9 nm [17]. Usualmente hay más cadenas no ramificadas hacia el exterior del cluster, mientras que las más ramificadas están hacia el interior del cluster, estas son las cadenas A y B respectivamente, a la cadena que contiene al extremo reductor del cluster se le conoce como cadena C (Fig. 2).



<http://sbu.ac.uk/water/hysta.htm>

Fig.2: Organización del gránulo de almidón. A) Representación de los enlaces α -1,6 en el polímero de glucosa. B) Organización de la molécula de amilopectina. C) Modelo de cluster de la amilopectina en la zona semicristalina. D) Corte de un granulo de almidón mostrando los anillos de crecimiento consistentes de regiones semicristalinas y amorfas.

En cada cluster, las cadenas se asocian para formar dobles hélices con seis residuos de glucosa por vuelta y que forman una estructura empaquetada y ordenada que da origen a la lamela cristalina, mientras que la lamela amorfa contiene los puntos de ramificación [16]. El modelo de cluster es consistente con la distribución observada para la longitud de las cadenas en la molécula de la amilopectina. Los picos existentes en la distribución corresponden a longitudes de cadena de 12-16 unidades de glucosa, de 40 y de 70 unidades de glucosa, y se propone que las cadenas de estas longitudes abarcan una, dos y tres lamelas cristalinas respectivamente [18].

Esta cristalinidad está asociada con el arreglo que presentan las dobles hélices de la amilopectina, y se ha clasificado en base a su patrón de difracción de rayos-X. Los almidones tipo A presentan cristales monoclinicos empaquetados de manera escalonada, lo que da como resultado una estructura mas densa; por otra parte los almidones tipo B presentan un acomodo hexagonal que es mas fácil de ser hidratado (Fig. 3.). Existe un almidón tipo C, pero este no presenta un patrón característico sino que se cree que es una combinación del A y el B. Los almidones tipo A se encuentran en la mayoría de los cereales, mientras que los B se encuentran en algunos tubérculos y cereales con alto contenido de amilosa; los almidones tipo C se encuentran en algunas legumbres [19].

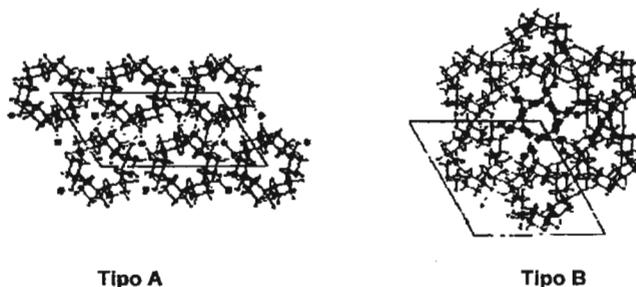


Fig. 3: Esquema de los dos distintos tipos de cristales de almidón. Se observa que en el tipo B se forma una cavidad central, la cual facilita su hidratación en comparación con los cristales tipo A [19].

En los gránulos de almidón provenientes de raíces y tubérculos, las regiones alternadas de lamelas cristalinas y lamelas amorfas forman zonas semicristalinas concéntricas del orden de cientos de nanómetros, estas zonas semicristalinas alternan a su vez con zonas amorfas en las cuales la organización de las moléculas de amilosa y amilopectina no está entendida. Al espacio que abarcan las zonas semicristalina y amorfa se le conoce como anillo de crecimiento [20].

En almidones de cereales la amilopectina es el componente más importante de las regiones cristalinas, mientras que la amilosa en este tipo de almidones se encuentra acomplejada con lípidos formando una débil estructura cristalina que refuerza al gránulo [15].

2. α -amilasas

Las α -amilasas (α -1,4-D-glucan glucanohidrolasas) son endoenzimas que presentan una estructura compuesta por múltiples dominios. El dominio A o dominio catalítico es el más conservado ya que se encuentra en todas las α -amilasas, consiste en una estructura simétrica de ocho láminas- β paralelas arregladas en forma de barril y rodeadas por ocho α -hélices. Esta estructura ha sido determinada por cristalografía con rayos-X en varios miembros de la familia de las α -amilasas [21]. El barril $(\beta/\alpha)_8$, primeramente fue observado en la triosa fosfato isomerasa de músculo de pollo [22] y por tanto es también conocido como barril TIM (Fig. 4).

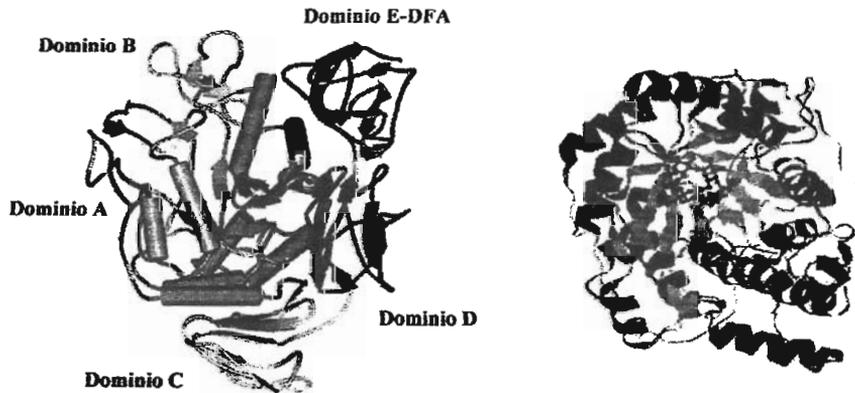


Fig. 4: Izquierda, modelo de la estructura correspondiente a una Ciclodextringlucosil transferasa (CGTasa), la cual contiene los dominios A, B, C, D y E. A la derecha el barril $(\beta/\alpha)_8$ característico del dominio A de la familia 13 de las glucosido hidrolasas [26].

En la mayoría de las α -amilasas, el dominio A se encuentra en el extremo N-terminal de la enzima, sin embargo, otros miembros de la familia tienen uno o más dominios N precediendo al dominio catalítico [23]. El papel del dominio N es incierto todavía y no es estructuralmente idéntico en todas las enzimas, aunque se ha mostrado en el caso de la α -amilasa I de *Thermoactinomyces vulgaris* que el dominio N puede actuar como un dominio de unión a sustrato [24].

En el dominio A, existen segmentos que unen las láminas- β a las hélices adyacentes del barril $(\beta/\alpha)_8$, los cuales generalmente portan residuos de aminoácidos del sitio activo; algunos de estos segmentos pueden ser lo suficientemente largos para ser considerados como dominios. En la mayoría de los estudios cristalográficos se encontró un largo segmento entre la tercera lámina- β y la tercer α -hélice, al que se le conoce como dominio B, el cual varía ampliamente en longitud, secuencia y estructura terciaria entre las diferentes amilasas [21].

Posterior al barril $(\beta/\alpha)_8$ se encuentra presente el dominio C, el cual esta formado por láminas- β y se cree que su función es estabilizar al dominio catalítico protegiendo a los residuos hidrofóbicos, aunque también se ha sugerido que el dominio C puede estar involucrado en la unión a sustrato [25]. Finalmente, un grupo de enzimas pertenecientes a las glucósido hidrolasas contienen uno o dos dominios adicionales en la porción C-terminal después del dominio C, los cuales presentan forma de láminas- β , estos son conocidos como dominios D y E [26].

Si las enzimas poseen ambos dominios D y E, normalmente no contienen un dominio N, y entonces son proteínas de cinco dominios, que poseen el barril catalítico $(\beta/\alpha)_8$ o dominio A además de los dominios B, C, D y E. En el caso de las proteínas de cuatro dominios sin dominio N, solo el dominio E pero no el D se encuentra presente. Las enzimas de cuatro dominios son principalmente hidrolasas, mientras que las de cinco dominios son principalmente transferasas. Cabe mencionar que la función del dominio D es aún desconocida, sin embargo el dominio E ha sido reconocido como un dominio de fijación al almidón insoluble (DFA), el cual facilita la degradación de los gránulos del almidón en las enzimas que lo contienen [27].

3. Clasificación de las α -amilasas.

Las enzimas con capacidad de hidrolizar las uniones glicosídicas (GHs) de diferentes polisacáridos como la celulosa, xilano, quitina, etc; presentan una gran diversidad, así pues existen celulasas, xilanasas, quitinasas, pululanasas, amilasas, etc. las cuales hidrolizan

selectivamente a sus respectivos sustratos. Debido a esta gran variedad es que se propuso un sistema de clasificación de las GHs en base a su secuencia de aminoácidos [28] y que hasta el momento abarca 100 familias de GHs (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

Este sistema basado en la secuencia primaria de las proteínas agrupa de manera común a enzimas con diferentes especificidades en una sola familia, además, debido a que la estructura de las proteínas se encuentra más conservadas que sus secuencias, un conjunto de familias se puede agrupar a su vez en superfamilias o clanes [29]. En el caso de las α -amilasas son enzimas que pertenecen a la familia 13 de las glucósido hidrolasas (GH 13), la cual abarca cerca de 30 diferentes especificidades (Tabla 1) y que junto con las familias GH 70 y GH 77 comparte la estructura catalítica de barril $(\beta/\alpha)_8$, por lo que forman el clan GH-H [30].

Número EC	Enzima	Clase	Estructura 3D conocida
3.2.1.1	α -amilasa	Hidrolasas	X
3.2.1.10	Oligo- α -glucosidasa		X
3.2.1.20	α -glucosidasa		
3.2.1.41	Pululanasa		
3.2.1.54	Ciclomaltodextrinasa		X
3.2.1.60	Maltotetraosa hidrolasa		X
3.2.1.68	Isoamilasa		X
3.2.1.70	Glucodextranasa		
3.2.1.93	Trealosa-6-fosfato hidrolasa		
3.2.1.98	Maltohexaosa hidrolasa		X
3.2.1.133	Amilasa maltogénica		X
3.2.1.135	Neopululanasa		X
3.2.1.141	Maltoligosiltrealosa trealohidrolasa		X
3.2.1.-	Maltopentaosa hidrolasa.		
2.4.1.4	Amilosacarasa	Transferasas	X
2.4.1.7	Sacarosa fosforilasa		X
2.4.1.18	Enzima glucano ramificante		X
2.4.1.19	Ciclomaltodextrin glucanotransferasa		X
2.4.1.25	4- α -glucanotransferasa		X
5.4.99.11	Isomaltulosa sintasa	Isomerasas	X
5.4.99.16	Trealosa sintasa		

Tabla 1: Actividades conocidas de las enzimas pertenecientes a la familia 13. (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>)

Para poder hidrolizar a su sustrato algunas glicosido hidrolasas presentan módulos de unión a carbohidratos (MUC) y que también tienen una clasificación en base a su secuencia. Hasta el momento existen 43 familias de MUC (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) y en el caso de los DFA existen en 6 familias que son: MUC20, MUC21, MUC25, MUC26, MUC34 y MUC41 de las cuales la más estudiada es la familia 20 [31].

Los DFA no son exclusivos de la familia GH 13 también conocida como familia de las α -amilasas, sino que se encuentran también en ciertas β -amilasas (GH 14) y en la mayoría de las glucoamilasas (GH 15). El DFA “clásico” consiste de láminas- β que forman un barril β distorsionado y se encuentra presente aproximadamente en el 10% de las enzimas amilolíticas de las familias GH 13, 14 y 15. En la familia de las α -amilasas, el DFA ha sido encontrado en por lo menos cinco de las casi treinta diferentes especificidades, en α -amilasa, maltotetrahidrolasa, maltopentahidrolasa, α -amilasa maltogénica, y CGTasa. Mientras que las primeras tres enzimas son proteínas de cuatro dominios, las últimas son proteínas de cinco dominios [26].

4. Mecanismo de acción.

La hidrólisis enzimática de los enlaces glucosídicos se lleva a cabo por catálisis ácida, la cual requiere dos residuos: un donador de protón y un nucleófilo o base. Esta hidrólisis ocurre mediante dos diferentes mecanismos, los cuales dan un producto que retiene o invierte la configuración del carbono anomérico. En ambos mecanismos la posición del donador de protón es idéntica, pero la base nucleofílica se encuentra más cercana del carbono anomérico en enzimas que retienen, que en las enzimas que invierten, las cuales deben de acomodar una molécula de agua entre la base y el carbohidrato [32].

El mecanismo aceptado para la familia de las α -amilasas es el de retención por doble desplazamiento (Fig. 5), en el cual se ven involucrados tres residuos catalíticos en el sitio activo, un ácido glutámico como el donador de protón y un aspartato como nucleófilo; un

tercer residuo de aspartato, posiciona al sustrato uniéndose a grupos hidroxilo mediante puentes de hidrógeno.

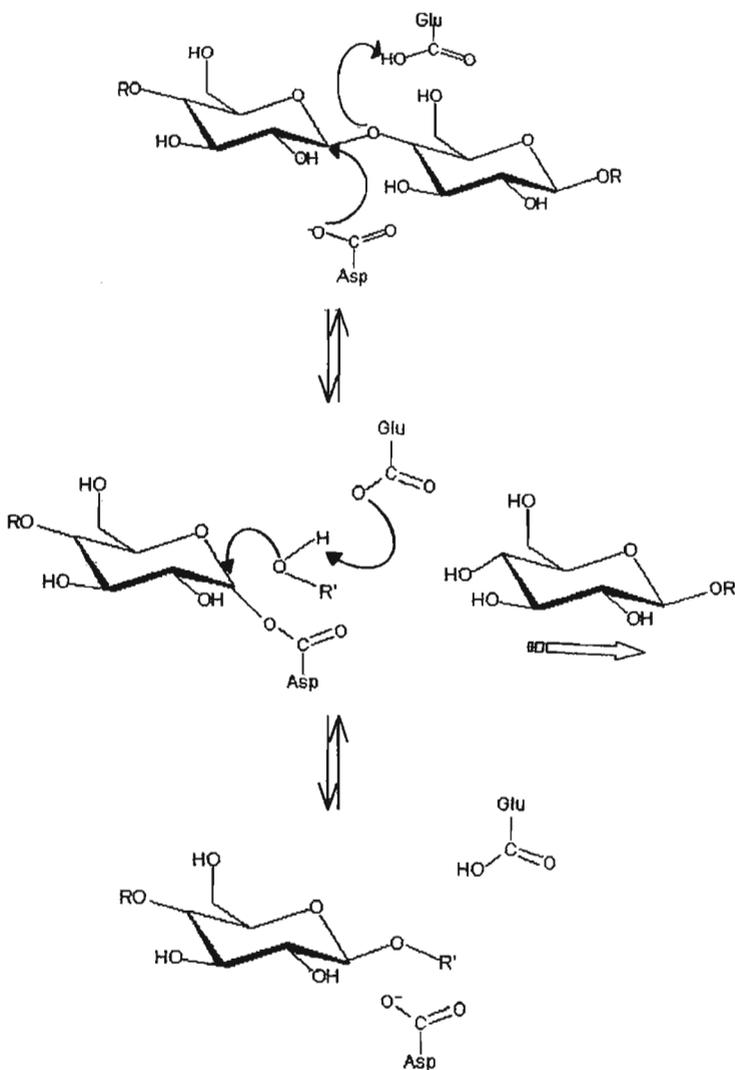


Fig. 5: Mecanismo de doble desplazamiento empleado por las enzimas de la familia de las α -amilasas, cuando R' se trata de un hidrógeno se presenta hidrólisis, cuando R' se trata de un azúcar es transglucosilación.

El mecanismo involucra cinco pasos: (i) Una vez que el sustrato ha sido unido al sitio activo, el ácido glutámico dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico entre los subsitios -1 y +1, mientras que el aspartato nucleofílico ataca al C1 de la glucosa en el subsitio -1. (ii) Se establece un estado de transición seguido por la formación de un intermediario covalentemente unido. (iii) El residuo de glucosa protonado en el subsitio +1 abandona el sitio activo, mientras que una molécula de agua (hidrólisis) o una nueva glucosa (transglucosilación) ataca la unión covalente entre la glucosa del subsitio -1 y el aspartato. (iv) Un nuevo estado de transición es formado. (v) El glutamato acepta un hidrógeno proveniente de la molécula de agua entrante o de la nueva glucosa en el subsitio +1 y el oxígeno perteneciente a la nueva molécula reemplaza la unión oxígeno-carbono existente entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato, formando un nuevo grupo hidroxilo en el C1 de la glucosa del subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre las glucosas de los subsitios -1 y +1 (transglucosilación) [15].

5. Regiones conservadas.

La similitud entre secuencias de enzimas de la familia de las α -amilasas es extremadamente baja (10%), sin embargo existen cuatro residuos de aminoácidos que son totalmente invariables: Los tres residuos catalíticos Asp 206, Glu 230 y Asp 297 según la numeración en la Taka-amilasa A y la Arg 204 localizada en la región β 4 [33].

Posteriormente se identificaron cuatro regiones conservadas que se encontraban posicionadas cerca del extremo C-terminal de las láminas β 3, β 4, β 5 y β 7 del barril (β/α)₈, estas son las regiones I, II, III y IV respectivamente [34], las cuales se han vuelto una marca distintiva de la familia de las α -amilasas (Tabla 2).

Fuente	Swiss – Prot	Enzima	Región I β 3	Región II β 4	Región III β 5	Región IV β 7
<i>P. mace</i>	P04830	CGTasa	162_DFPANH_167	252_GIRF[AVKH_260	285_RWYL_288	351_FIDNH[356
<i>P. amylo.</i>	P10342	Isoamilasa	318_DVVYNH_323	397_GFRE[LASV_405	461_PPW_464	531_FIDVH[536
<i>K. aero.</i>	P07811	Pululanasa	619_DVVYNH_624	690_GFRE[LMGY_698	723_RGWD_726	846_YVSKH[851
<i>B. stearo.</i>	P06279	α -amilasa	135_DVVFDH_140	264_GFRL[AVKH_272	298_RYWS_301	360_FVDNH[365
<i>B. amylo.</i>	P00692	α -amilasa	132_DVVLNH_137	258_GFRI[AAKH_266	292_RYWQ_295	354_FVENH[359
<i>A. oryzae</i>	P10529	α -amilasa	138_DVVANH_143	223_GLRI[TVKH_231	251_RVLD_254	313_FVENH[318
Humana,s	P19961	α -amilasa	111_DAVINH_116	208_GFRI[ASKH_216	248_RVID_251	310_FVDNH[315
Cebada	P00693	α -amilasa	112_DIVINH_117	200_AWRI[FARG_208	229_RVWD_232	310_FVDNH[315
<i>A. aegypti</i>	P53354	α -amilasa	352_DVVVNH_357	443_GFRM[ACKH_451	484_RVID_487	547_FVDNH[552

Tabla 2: Regiones conservadas presentes en los miembros de la familia 13 de las glucósido hidrolasas. Las fuentes de las enzimas se encuentran abreviadas de la siguiente manera: *P. mace*. *Paenibacillus macerans.*, *P. amylo.* *Pseudomonas amyloclavata.*, *K. aero.* *Klebsiella aerogenes.*, *B. stearo.* *Bacillus stearothermophilus.*, *B. amylo.* *Bacillus amyloliquefaciens.*, *P. furiosus* *Pyrococcus furiosus.*, *A. oryzae* *Aspergillus oryzae.*, s, saliva. Los residuos catalíticos invariables se encuentran resaltados en negro y las entradas corresponden al Swiss Prot.

De manera adicional a estas cuatro regiones, se ha propuesto la existencia de otras tres regiones conservadas, las regiones VI y VII que se encuentran en las láminas $\beta 2$ y $\beta 8$ y la región V que se localiza cerca de la porción C-terminal del dominio B y contiene un residuo de aspartato responsable de la unión a Ca^{2+} . Estas regiones ayudan a discriminar entre distintos miembros de la misma familia de las α -amilasa desde el punto de vista de su especificidad y su estructura [35].

Recapitulando, para que una enzima pertenezca a la familia GH 13 debe cumplir con las siguientes características: (i) Actuar sobre las uniones α -glucosídicas e hidrolizarlas para producir mono u oligosacáridos α -anoméricos (hidrólisis), o bien formar enlaces α -1,4 o α -1,6 (transglucosilación) o presentar ambas actividades mencionadas. (ii) Deben poseer una estructura de barril (β/α)₈ o TIM con los residuos catalíticos sombreados en la tabla y (iii) presentar cuatro regiones conservadas en su secuencia primaria donde se encuentran los aminoácidos que forman el sitio catalítico, así como aminoácidos que son esenciales para la estabilidad del barril TIM [15].

6. Función de los Dominios de Fijación a Carbohidratos.

Como ya se mencionó, las enzimas que degradan carbohidratos, como las celulasas, xilanasas, amilasas, etc. pueden presentar dominios de unión a sustrato que funcionan de manera independiente a los dominios catalíticos y frecuentemente se hallan conectados a estos a través de una secuencia de unión o linker rico en prolina, treonina y/o serina.

El reconocimiento y unión al sustrato por parte de estos dominios es extremadamente específico, por ejemplo, la xilanasasa D de *Cellulomonas fimi* posee dos dominios de fijación a sustrato, uno específico para xilano y el otro para celulosa [36], es claro entonces, que la principal función de los dominios de fijación a carbohidratos (DFC) es anclar a la enzima a su sustrato polimérico y por tanto incrementar la concentración efectiva de sustrato en el sitio activo [27], por otra parte, se ha mencionado que los DFC pueden tener una segunda función que es la de desestabilizar al sustrato de manera que sea más accesible para el sitio

catalítico y por tanto se acelere su hidrólisis; este es el caso del dominio de unión a celulosa de la endoglucanasa A de *Cellulomonas fimi* [37] y del DFA de una glucoamilasa de *Aspergillus niger* [38].

Sin embargo, la función de desestabilización del sustrato por acción del DFC, es un aspecto muy discutido, ya que también se ha demostrado que no en todos los casos se presenta el efecto de disrupción [39], lo cual sugiere que los dominios de unión pueden desempeñar diferentes roles dependiendo del contexto de la enzima ó del número de sitios de unión.

Con la finalidad de comprender mejor el mecanismo y las funciones que puedan tener los DFC, se han determinado por resonancia magnética nuclear sus estructuras en estado libre y unidos a un sustrato, tal es el caso del DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la cual se estudio en ausencia y presencia de β -ciclodextrina y se observaron las diferencias presentes en su arreglo [40]. Los resultados denotaron la presencia de dos sitios de unión a sustrato en los cuales están involucrados residuos aromáticos conservados; para el sitio 1 dos residuos de triptófano forman un espacio compacto, rígido e hidrofóbico que queda expuesto a la superficie donde interaccionan directamente con las moléculas de glucopiranosas de la β -ciclodextrina, mientras que para el sitio 2 son dos residuos de tirosina los que intervienen, abarcando un espacio mas extendido que el sitio 1, y al igual que este, las interacciones que presenta con la β -ciclodextrina son de carácter hidrofóbico

La estructura del sitio 1 cambia muy poco con la unión de su ligando, mientras que el sitio 2 presenta un cambio significativo al unirse a su ligando, lo que indica que probablemente el sitio 1 esta involucrado en un reconocimiento inicial del sustrato y el segundo sitio se encarga de un reconocimiento mas específico que guía al sustrato hacia el sitio activo. En el estudio se observo que las hélices del almidón adoptan un arreglo perpendicular, esto es de importancia porque se cree que las hélices del almidón en la superficie del gránulo son normalmente paralelas, lo que es cierto para las regiones cristalinas; por lo que se piensa en que el DFA está localizando a la enzima en la región no cristalina (y por tanto más fácil de hidrolizar) del almidón; o bien que el DFA está forzando a las cadenas del almidón a

apartarse y por tanto contribuye al quebrantamiento de los gránulos; esta última opción nos vuelve a sugerir la posible función de disrupción que tienen los DFC [35].

7. Amilasas en la Industria.

En la industria de transformación del almidón las α -amilasas han tenido gran uso como un reemplazo de los agentes químicos en la producción de hidrolizados de almidón. El proceso enzimático mediante el cual se lleva al almidón hasta jarabes con alto contenido de glucosa involucra varios pasos, en el primero de ellos se lleva a cabo la licuefacción mediante la adición de α -amilasa a una suspensión de almidón a una temperatura de 95-105°C y a pH 6 durante 90min; el producto de este primer paso son dextrinas de cadena corta, observándose una disminución en la viscosidad del medio. Originalmente en este paso se usaba la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens*, pero esta ha sido reemplazada por la de *B. stearothermophilus* o *B. licheniformis* [15]

El siguiente paso es la sacarificación del hidrolizado de almidón dando como resultado jarabes de alta concentración de glucosa (más del 95%), para ello se emplea una glucoamilasa que hidroliza las uniones glucosídicas α -1,4 a partir de extremos no reductores, la de mayor uso es la de *Aspergillus niger* que tiene un pH óptimo de 4.2 y es estable a 60°C; para llevar a cabo una eficiente sacarificación se ajusta el pH a 4.5 y se deja de 12 - 96 h a una temperatura de 60 – 62°C.

Un tercer paso es la conversión de los jarabes con alto contenido de glucosa a jarabes de alto contenido de fructosa, la cual es un isómero de la glucosa y es casi dos veces más dulce que esta. Para llevar a cabo esta conversión se usa una glucoasa isomerasa, los máximos niveles de fructosa alcanzados son del 55% [15]. Estos jarabes de fructosa y glucosa son usados en bebidas, confitería, como endulzantes, como sustratos en fermentaciones para obtener diversos productos como etanol, aminoácidos, etc. [40].

Otras aplicaciones de las α -amilasas son en la industria de la panadería, donde aumentan el volumen y mejoran la textura del producto, además de que retardan su envejecimiento. En textiles se usan para la preparación de soluciones viscosas de almidón para el engomado de fibras textiles y también se emplean para el desengomado; en la clarificación de cerveza y jugos de frutas; para pretratar alimento animal y aumentar su digestibilidad y en la industria de lavandería se incluyen en detergentes y limpiadores. Solamente una transferasa de la familia de las α -amilasas es de uso comercial, la CGTasa, la cual se emplea para la producción de ciclodextrinas, que son moléculas utilizadas principalmente para la encapsulación de otros compuestos [15].

8. Bacterias lácticas amilolíticas.

Las bacterias lácticas pertenecen al grupo de las bacterias Gram-positivas. Dependiendo de las condiciones de cultivo y de la especie bacteriana estos microorganismos producen ácido láctico como producto único (vía homofermentativa) o mayoritario de su metabolismo (vía heterofermentativa). Las bacterias lácticas homofermentativas transforman una molécula de glucosa en dos moléculas de lactato por la vía de la glucólisis, por otra parte las bacterias lácticas heterofermentativas transforman una molécula de glucosa en una molécula de lactato, una de dióxido de carbono, y una molécula de etanol o de acetato mediante la vía de las pentosas-fosfato, cabe mencionar que también existen bacterias lácticas heterofermentativas facultativas, es decir, son capaces de usar una u otra vía [41].

Entre los géneros que se incluyen en el grupo de bacterias lácticas con forma cocoide están *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* y *Atopobium*; y en forma de bacilo se encuentran *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Algunas de estas bacterias son utilizadas para la conservación de alimentos, de hecho, la fermentación láctica es uno de los métodos más utilizados, ya que contribuye a la producción de moléculas antimicrobianas e inhibe la microflora patógena y a los microorganismos responsables de la alteración de la calidad de los productos [42].

Ciertas bacterias lácticas que se desarrollan en fermentaciones vegetales pueden utilizar al almidón como fuente de carbono, por ejemplo, *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* se aislaron de desperdicios de maíz en E.U.A. [4,7], *Lactobacillus plantarum* se aisló a partir de raíz de yuca fermentada en el Congo y Nigeria [6], *Lactobacillus manihotivorans* fue aislado de harina agria de manioca en Colombia [8], etc. Entre las amilasas que se han caracterizado de bacterias lácticas se encuentran las de estos tres últimos lactobacilos, todas muestran actividad óptima a pH cercano a 5 y una temperatura óptima alrededor de 60-65°C [43-45].

El estudio de las α -amilasas de *Lactobacillus plantarum* y de *Lactobacillus amylovorus* denoto que ambas son capaces de hidrolizar al almidón insoluble [46,47] aunque con diferente eficiencia [48]. La comparación de la secuencia genética de la α -amilasa de *L. amylovorus* y *L. plantarum* [10] con la de la α -amilasa de *L. manihotivorans* [11] demostró una homología del 98% y un tamaño de proteína de 100 kDa, lo que es casi el doble de las amilasas conocidas (50-60 kDa).

La estructura de estos genes puede dividirse en dos partes: (i) La primera mitad, desde el extremo 5' del gen hasta el sitio *Bam*HI, contiene las secuencias características de los promotores de lactobacilos y codifica para el sitio catalítico; (ii) la segunda mitad del gen abarca a partir del sitio *Bam*HI hasta el extremo 3' y presenta un arreglo en secuencias o unidades repetidas, directas e idénticas de 273 nucleótidos cada una; en la α -amilasa de *L. plantarum* y *L. manihotivorans* cuatro unidades se encuentran presentes mientras que en el caso de *L. amylovorus* se observan cinco (Fig. 6).

Estas unidades repetidas conforman el DFA [13,14], hasta el momento solo se conoce otro caso de un DFA de α -amilasa con secuencias repetidas, el de la α -amilasa de *Bacillus sp.* no. 195 con 2 UR [49]. Sin embargo en otras glucósido hidrolasas las UR son una característica un más común, por ejemplo en las glucano-sacarasas de *Streptococcus ssp.* y de *Leuconostoc mesenteroides* se han observado, en el extremo C-terminal de las proteínas, UR que son responsables de interaccionar con los glucanos [50], también se han encontrado

UR que están involucradas en la unión a carbohidrato en proteínas que no tienen actividad de glucósido hidrolasa como en las toxinas A y B de *Clostridium difficile* [51].

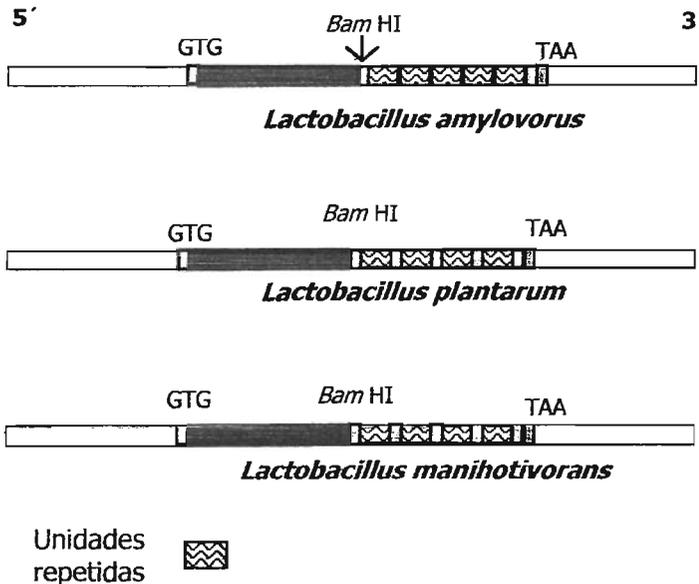


Fig. 6: Representación de los genes de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, donde la primera mitad del gen codifica para el dominio catalítico y la segunda para el DFA. El DFA de *L. amylovorus* presenta 5 UR mientras que los de *L. manihotivorans* y *L. plantarum* contienen 4 UR.

Comparando una sola secuencia repetida de la α -amilasa de *L. amylovorus* con los DFA conocidos de otras amilasas se revela la presencia de residuos conservados de aminoácidos aromáticos (triptófano y tirosina) que han sido catalogados como importantes para la unión a sustrato en otras amilasas, lo que conduce a pensar que una sola secuencia puede tener función de fijación al sustrato insoluble, así pues, se realizaron estudios de adsorción sobre almidón insoluble con una y las cinco UR de esta α -amilasa; los datos obtenidos demostraron que ambos péptidos son capaces de adsorberse al almidón, aunque las cinco UR lo hacen con mucho mayor afinidad [14].

Los resultados mencionados sugieren la idea de un efecto cooperativo en la adsorción del DFA, en donde cada UR contribuiría a adsorber la enzima al sustrato. Con el fin de contribuir a la caracterización del fenómeno de adsorción de este nuevo DFA, en esta tesis se trabajó con un número intermedio de UR y se determinó su capacidad de adsorción sobre el almidón insoluble.

Objetivo:

- ☼ Determinar la capacidad de adsorción al almidón insoluble de dos y tres unidades repetidas de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

Hipótesis:

- △ Si una sola unidad repetida, aislada del dominio catalítico, es capaz de adsorberse al gránulo de almidón entonces las proteínas correspondientes a 2UR y 3UR deberán adsorberse con mayor eficiencia al almidón insoluble.

MATERIAL Y MÉTODO:

Estrategia General.

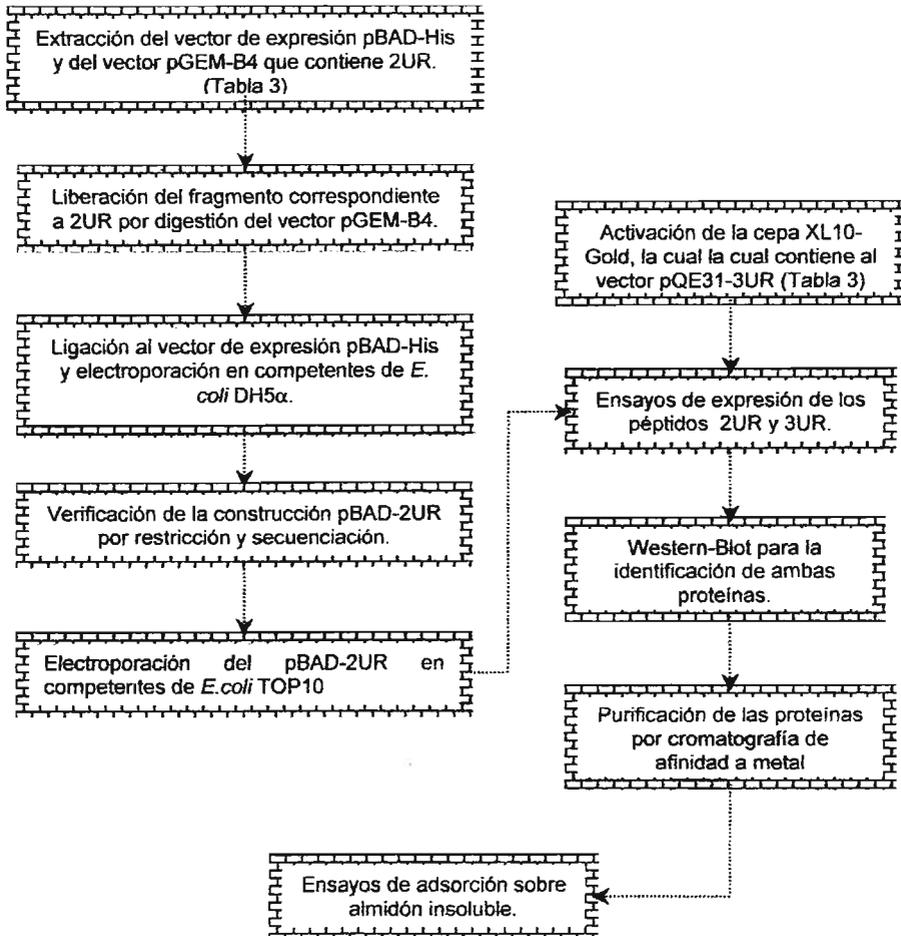


Tabla 3: Características generales de los microorganismos y plásmidos utilizados.

Microorganismo	Características
<i>E. coli</i> TOP10	F <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD 139Δ(araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG.</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>Tet^rΔ(merA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte[F⁺proAB lacI⁹ZΔM15Tn10(Tet^rAmyCam^r)]</i>

Vector	Características
pGEM-B4	Derivado del pGEM-T Easy (Promega) que es un vector para clonar productos de PCR, contiene el fragmento correspondiente a dos UR
pBAD-HisC	Es un vector de expresión de 4.1 kb que fusiona un tallo de histidinas a la proteína de interés para su identificación y purificación, contiene el operador de arabinosa y como marcador un gen de resistencia a ampicilina
pQE31	Es un vector de expresión de 3.5 kb que fusiona un tallo de histidinas a la proteína de interés para su identificación y purificación, contiene el promotor y dos secuencias de operadores <i>lac</i> y como marcador un gen de resistencia a ampicilina.
pLPCR2/3	Vector que contiene el gen de 5.5 kb de la α -amilasa de <i>L. amylovorus</i>
pQE31-5UR	Derivado del pQE31, en el cual se clono mediante restricción del pLPCR2/3 el fragmento correspondiente a las 5UR.
pQE31-3UR	Se deriva del vector pQE31-5UR en el que se realizaron deleciones por PCR para obtener el fragmento correspondiente a 3UR.

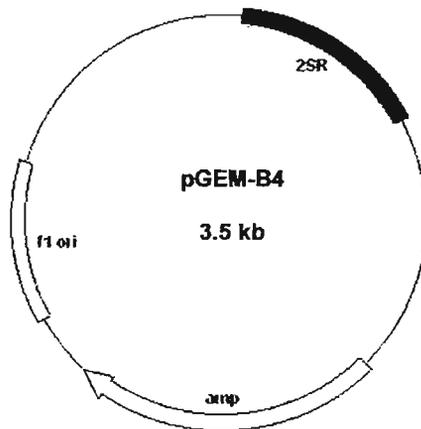
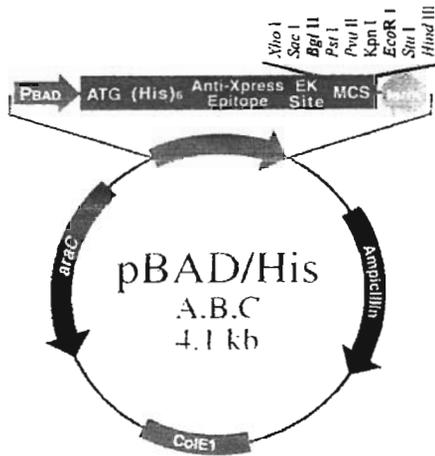


Fig. 7: pGEM-B4, derivado del pGEM-T Easy (Promega) que es un vector para clonar productos de PCR, el cual contiene el fragmento correspondiente a dos UR.
 β -lactamasa ORF: 1337-2197pb.
 región del fago f1: 2380-2835pb.
 2UR: 61-611pb.



Región promotora del operón de arabinosa *araBAD*: 4-276pb.
 Codón de inicio ATG: 319-321pb.
 Tallo de histidinas 6XHis: 331-348pb.
 Sitio múltiple de clonación: 430-470pb.
 Terminador de transcripción *rrnB*: 553-710pb.
 β -lactamasa ORF: 9891849pb.
araC ORF: 4076-3198pb.
 origen *ColE1*: 4076-3198pb.

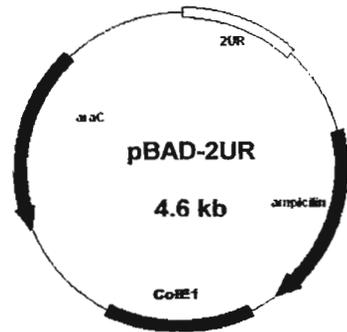


Fig 8: A la izquierda descripción del vector pBAD-HisC en el cual se inserto el fragmento correspondiente a 2UR entre los sitios de restricción *EcoR* I y *Bgl* II. A la derecha representación de la construcción pBAD-2UR que codifica para el péptido 2UR.



Fig. 9: pQE31-3UR, derivado del vector de expresión pQE31-5UR.
 Promotor T5 y operadores *lac*: 7-87pb.
 Codón de inicio ATG: 115-117pb.
 3UR: 147-972pb.
 Terminador de transcripción *rrnB*: 1891-1989pb.
 origen *ColE1*: 1891-1989pb.
 β -lactamasa ORF: 4083-3223pb.

Conservación de las cepas:

Las cepas de *E. coli* usadas en este trabajo fueron DH5 α para la clonación del fragmento correspondiente a dos de las cinco UR del DFA del gen de la α -amilasa de *L. amylovorus* (*amyA*); TOP10 para la expresión del péptido correspondiente a dos UR y XL10-Gold (Stratagene) para la expresión del péptido correspondiente a tres UR. Todos los microorganismos se conservaron en glicerol al 40 % a una temperatura de -70°C.

Medios utilizados y extracción de ADN:

En general los cultivos fueron crecidos en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la obtención de plásmidos se realizó la extracción siguiendo el método de lisis alcalina [52], la visualización de los plásmidos se llevo a cabo en geles de agarosa al 0.8%.

Construcción de pBAD-2UR:

El plásmido pGEM-B4, en el cual previamente se clonaron dos unidades repetidas del gen *amyA* amplificadas por PCR [53], fue sometido a una doble digestión con *EcoRI* y *BamHI* para liberar al fragmento de aproximadamente 550 pb que corresponde a dos UR y el cual se purificó mediante centrifugación en columnas de fibra de vidrio. De manera simultánea se digirió al vector de expresión pBAD-HisC con *EcoRI* y *BglIII* para formar sitios compatibles con los del fragmento (*BglIII* forma un sitio compatible con *BamHI*), el cual fue ligado utilizando ligasa T4 a 4°C durante toda la noche. La visualización del fragmento liberado y del plásmido pBAD digerido se realizó en geles de agarosa al 0.8%

Transformación y Secuenciación:

Se elaboraron células competentes de *E. coli* DH5 α y TOP10 siguiendo el método de producción de electrotansformantes de alta eficiencia [54], la construcción pBAD-2UR se electroporó en *E. coli* DH5 α . En colonias seleccionadas al azar se verificó la presencia del inserto mediante doble restricción del plásmido electroporado con *XhoI* y *HindIII*. A una de las transformantes se le extrajo el plásmido el cual se purificó utilizando el "Plasmid mini kit" (Qiagen) y se envió a Laragen Inc. (10755 Venice Blvd., Los Ángeles) para determinar su secuencia. Para la expresión de las 2 UR el pBAD-2UR fue electroporado en *E. coli*

TOP10, la cual es una cepa mas eficiente para la expresión del péptido ya que mantiene una concentración constante de inductor debido a que esta cepa es capaz de transportar arabinosa pero no de metabolizarla.

Expresión e Identificación de los péptidos 2UR y 3 UR:

Se creció un preinóculo durante 8 h en medio LB-amp (100µg/mL) y se inoculó al 1% en el mismo medio fresco, para inducir la expresión de las 2 UR se probaron tres diferentes concentraciones de arabinosa, 0.002%, 0.02% y 0.2% muestreándose a las 0, 4, 8 y 12 h. Las muestras se analizaron en geles de SDS-PAGE al 10% [55] para su identificación, se aprovechó que el vector fusiona un tallo de histidinas al péptido, por lo que se realizó por Western-Blot (Fig.15) con anticuerpo anti-His.

En el caso de la expresión del péptido 3 UR se probaron dos concentraciones de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranosido) el cual es un análogo de lactosa, no metabolizable, las concentraciones probadas fueron 0.4 mM y 0.8 mM y se muestreo a las 0, 2, 4 y 8 h. Las muestras se analizaron en geles de SDS-PAGE 10% [55] y se identificó al péptido mediante Western-Blot también utilizando anticuerpo anti-His.

Purificación de las 2 y 3 UR:

Las células fueron crecidas a las condiciones óptimas establecidas y se colectaron por centrifugación, se mantuvieron en congelación y al momento de extraer las proteínas se resuspendieron en tampón de fosfatos pH 7.4 con imidazol 0.05 M, posteriormente se lisaron por sonicación y se filtró el sobrenadante para eliminar detritos celulares. De manera simultánea se preparó una columna de sefarosa niquelada para poder purificar a los péptidos de interés mediante cromatografía de afinidad, ya que los anillos de imidazol que poseen la histidinas fusionadas a las UR interaccionan con los átomos de Ni⁺⁺, permitiendo de esta manera su inmovilización al pasar el sobrenadante por la columna y posteriormente su elusión al lavar la columna con un tampón de fosfatos con imidazol a una concentración 0.25 mM. Durante todo el proceso la temperatura se mantiene a 4 °C.

Una vez purificados los péptidos de 2 UR y 3 UR, se dializaron contra tampón de citratos-fosfatos pH 5.0 y se concentraron las muestras en un SpeedVac. la cantidad de proteína obtenida se determinó midiendo absorbancia a 280 nm.

Ensayo de adsorción:

Para realizar los ensayos de adsorción se incubaron durante media hora concentraciones crecientes de los péptidos puros (2UR y 3UR) con una suspensión de almidón de maíz insoluble en buffer de citratos-fosfatos pH 5.0 a 4 °C, después de lo cual se centrifugó el almidón y se conservó el sobrenadante; la cantidad de proteína que se adsorbió al almidón insoluble se determinó por diferencia entre la cantidad de proteína añadida y la cantidad de proteína que queda en el sobrenadante leyendo la absorbancia a 280 nm.

El coeficiente de extinción molar (ϵ) de ambos péptidos se obtuvo en base a la secuencia de los péptidos, utilizando el programa de análisis de estructura primaria ProtParam de ExPASy (<http://ca.expasy.org/>). Aplicando la ley de Lambert y Beer ($Abs = C \cdot \epsilon \cdot l$) los datos de absorbancia obtenidos fueron convertidos a concentración de proteína para poder graficar los mg de proteína libre contra los mg de proteína adsorbida por mg de almidón insoluble.

RESULTADOS:

Obtención del fragmento 2UR

Dos de las cinco unidades repetidas del DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* se encuentran codificadas en el plásmido pGEM-B4, el cual es derivado del pGEM-T Easy (Promega) que es un vector para clonar productos de PCR. El fragmento de aproximadamente 550 pb que corresponde a las 2UR fue liberado del pGEM-B4 por medio de una doble digestión con *EcoRI* y *BamHI*, el primer sitio de restricción pertenece al vector, mientras que el segundo sitio de restricción es parte del gen de interés y se encuentra en el extremo 5' del fragmento. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para separar al fragmento del resto del vector, la banda correspondiente a 2UR se cortó del gel y se purificó en columnas de fibra de vidrio.

De manera simultánea el vector de expresión pBAD-His fue digerido con *EcoRI* y *BamHI* para crear sitios compatibles con los del fragmento y también se purificó en columna de fibra de vidrio tras haber obtenido la banda de ADN en un gel de agarosa al 0.8 %. (Fig. 10).



Fig. 10: Gel de agarosa al 0.8 % donde se muestra:
C1: MPM
C2: Fragmento correspondiente a las 2 UR ya purificadas.
C3: pBAD-His digerido con *EcoRI* y *BglII* ya purificado.
C4: pBAD-His sin digerir.

El vector digerido y las 2UR se ligaron toda la noche a 4 °C con ligasa T4. La construcción se electroporó en células competentes de *E. coli* DH5 α con una eficiencia aproximada de

1.5 x 10⁸ UFC/ µg ADN. De las transformantes obtenidas se seleccionaron una docena de colonias para extraer ADN y verificar la presencia de la construcción mediante una doble digestión con *Xho*I / *Hind*III, la cual debe liberar al fragmento ya que este último se encuentra insertado entre los sitios de restricción mencionados (Fig. 11).

C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11

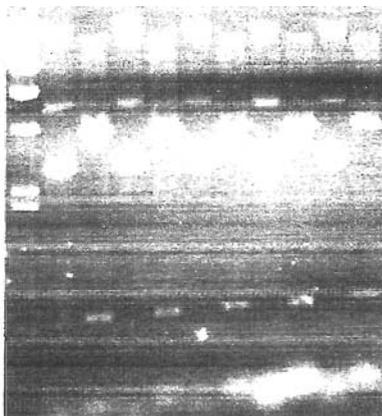


Fig. 11: Gel de agarosa donde se muestran las construcciones obtenidas y al fragmento correspondiente a 2UR liberado.

C1: MPM
 C2: pBAD-2UR colonia 1
 C3: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
 C4: pBAD-2UR colonia 2
 C5: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
 C6: pBAD-2UR colonia 3
 C7: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
 C8: pBAD-2UR colonia 4
 C9: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
 C10: pBAD-2UR colonia 5
 C11: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III

Secuenciación.

Se seleccionó una de las colonias para propagación y extracción del pBAD-2UR con alto grado de pureza mediante el uso de una resina de intercambio aniónico (Qiagen plasmid midi kit). Una vez purificado se mandó secuenciar para verificar que las UR se encuentran en marco de lectura (Fig. 12).

```

ATGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGGGATC
TGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGATCCGACCTCGAGATCCAACAAGCAGCAGCAGTACAACAACAGA
AACTAAAAAGGTTTATTTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAAT
ACGAATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAAAAAATGACCGCTTTAGGTAACGACGAATATGAATTGG
ATCTCGACACTGATGAAGTACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGC
TAATGAGGCTGGTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTCTGTAATAAAAGGTTTATTTT
GAAAAGCCTTCAAGTTGGGCTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAAATAAGCTATAACTT
CAGCTTGGCCTGGCAAAAAAATGACCGCTTTAGGTAACGACAAATATGAATTGGATCTCGACACTGATGAAGA
TGACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGCTAATGAGGCTGGTTTACCT
TTTACCGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTCTGTAAGAACTTCTGATTCAAGCAGCACATCAAGCAATT
CG
  
```

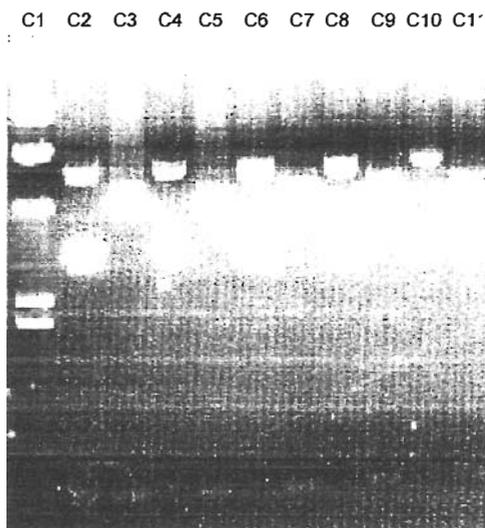
Fig. 12: Arriba: Secuencia consenso del fragmento de interés. Resaltado en negro los codones de inicio y término, el tallo de histidinas se encuentra subrayado., en negritas las dos unidades repetidas. Abajo: La traducción teórica de la secuencia, que resulta en un péptido de 244 aminoácidos y una talla de 26.9 kDA.

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWIRPRDPTSSSSTTTTETKKVYFEKPSSWGSR
 VYAYVYNKNTNKAITSAWPGKKMTALGNDEYELDLDTDEDDSDLAVIFTDGTKQTPAANEAG
 FTFTADATYDQNGVYKKVYFEKPSSWGSRVYAYVYNKNTNKAITSAWPGKKMTALGNDEYEL
 DLDTDEDDSDLAVIFTDGTKQTPAANEAGFTFTADATYDQNGVVRTSDSSSSTSSNS-

Se escogió la cepa de *E. coli* DH5 α para clonar las dos UR debido a que es una cepa no recombinante, al comprobar que la construcción era adecuada se volvió a electroporar, en esta ocasión, a *E. coli* TOP10 (Fig. 13), ya que esta cepa a diferencia de la cepa DH5 α la cual transporta y metaboliza a la arabinosa, es capaz de transportar arabinosa pero no metabolizarla, y por tanto se mantienen los niveles de inductor constantes permitiendo optimizar la expresión del péptido 2UR.

Fig. 13: Gel de agarosa al 0.8% donde se verificaron las construcciones electroporadas en *E. coli* TOP10.

- C1: MPM
- C2: pBAD-2UR colonia 1
- C3: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
- C4: pBAD-2UR colonia 2
- C4: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
- C6: pBAD-2UR colonia 3
- C7: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
- C8: pBAD-2UR colonia 4
- C9: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III
- C10: pBAD-2UR colonia 5
- C11: pBAD-2UR con *Xho*I / *Hind*III



Expresión de 2 y 3 UR

Para determinar las condiciones adecuadas de expresión de las 2 UR se probaron 3 concentraciones del inductor (L-arabinosa) de 0.002%, 0.02% y 0.2% a tiempos de 4, 8 y 12 h. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para establecer la condición óptima de expresión (Fig. 14).

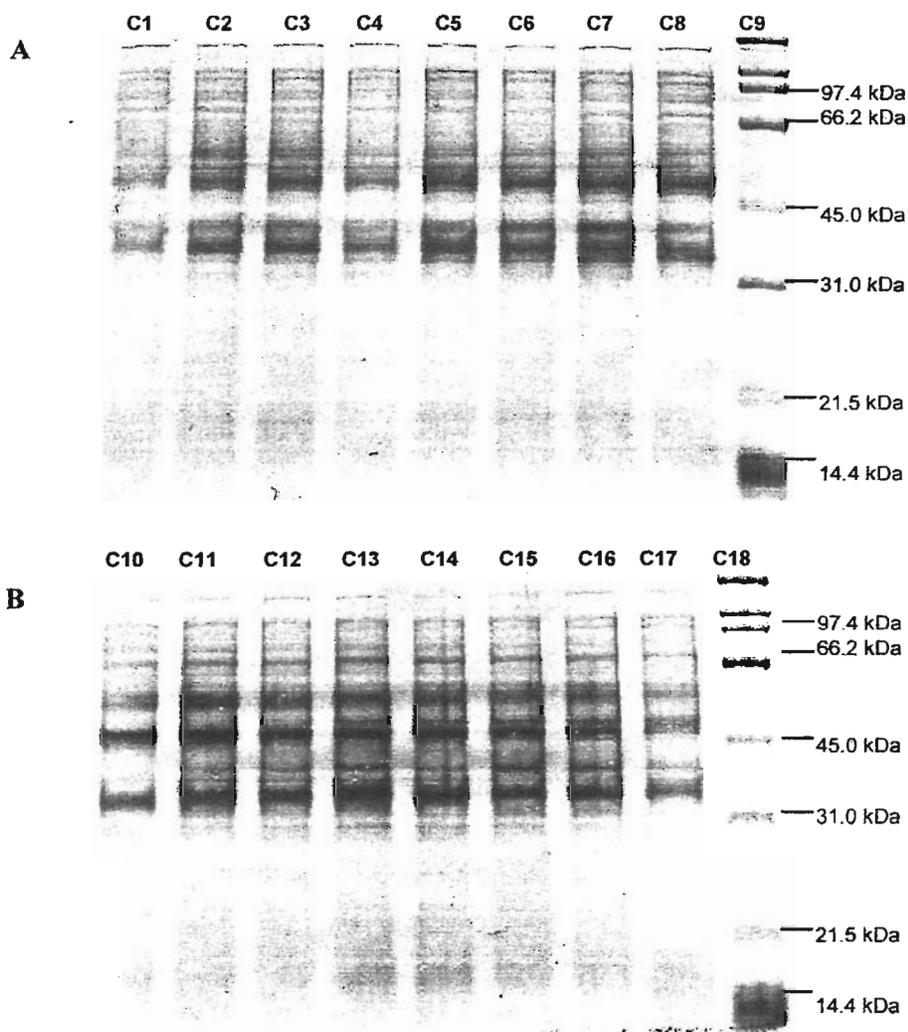


Fig. 14: Análisis del ensayo de expresión en gel SDS-PAGE al 10%, utilizando como inductor arabinosa (ara). (A) C1: Muestra sin ara a las 0 h., C2: Muestra con ara 0.002% a las 0., C3: Muestra con ara 0.02% a las 0 h., C4: Muestra con ara 0.2% a las 0 h., C5: Muestra sin ara a las 4 h., C6: Muestra con ara 0.002% a las 4., C7: Muestra con ara 0.02% a las 4 h., C8: Muestra con ara 0.2% a las 4 h., C9: MPM. (B) C10: Muestra sin ara a las 8 h., C11: Muestra con ara 0.002% a las 8., C12: Muestra con ara 0.02% a las 8 h., C13: Muestra con ara 0.2% a las 8 h., C14: Muestra sin ara a las 12 h., C15: Muestra con ara 0.002% a las 12 h., C16: Muestra con ara 0.02% a las 12 h., C17: Muestra con ara 0.2% a las 12 h., C18: MPM.

Al comparar los carriles en los geles de células inducidas y células sin inducir no se vislumbra la presencia de una banda diferente que nos indique las presencia del péptido, por lo que se efectuó un Western-Blot para identificar al péptido utilizando un anticuerpo anti-His.

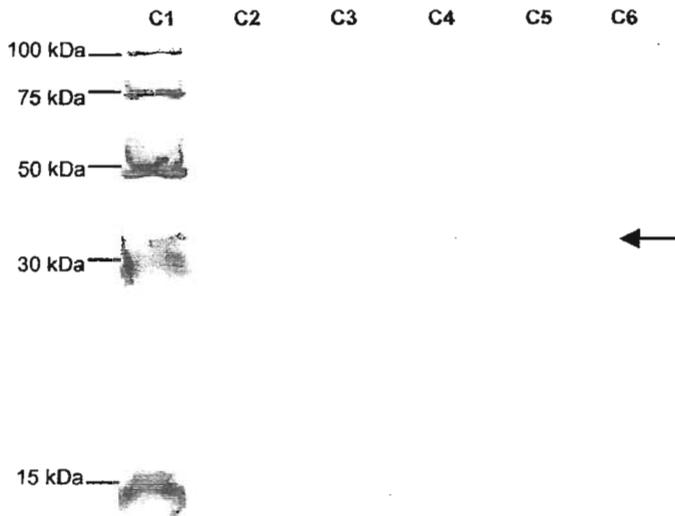


Fig. 15: Western-Blot del péptido 2UR a 12 h de inducción. C1: MPM. 6xHis (Qiagen), C2: *E. coli* TOP10-2UR sin ara., C3: *E. coli* TOP10-2UR c/ara 0.002%, C4: *E. coli* TOP10-2UR c/ara 0.02%, C5: *E. coli* TOP10-2UR c/ara 0.2%, C6: *E. coli* DH5 α -2UR c/ara 0.2%. Proteína de interés (\leftarrow).

Como se puede observar en la figura 15, la concentración del inductor no parece tener efecto en los niveles de expresión de la proteína por lo que las condiciones establecidas para la expresión del péptido 2 UR en *E. coli* TOP10 fueron 12 h de inducción con arabinosa al 0.002%.

En el caso del péptido 3 UR de talla aproximada de 36.5 kDa, se uso como inductor IPTG (Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosido), el cual es un análogo no metabolizable de la lactosa, y se probó a concentraciones de 0.4 mM y 0.8 mM, muestrándose a tiempos de 0, 2, 4 y 8 h.

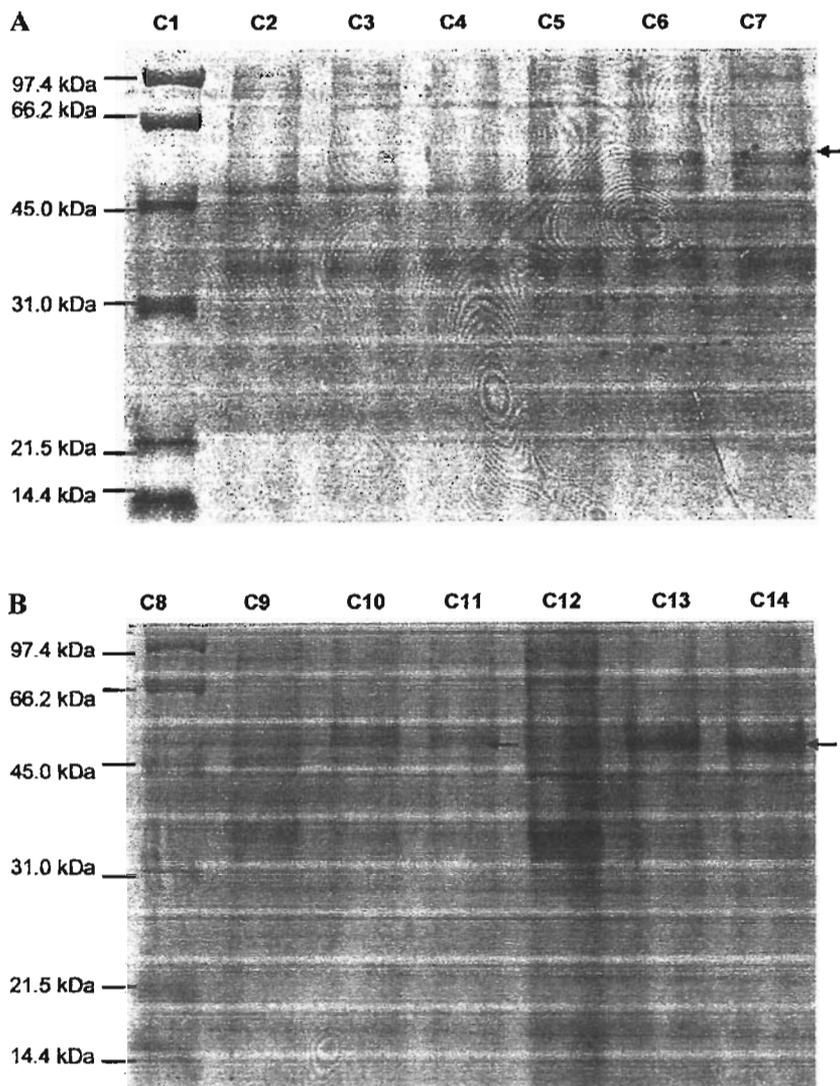


Fig. 16: Análisis del ensayo de expresión de 3 UR en gel SDS-PAGE al 10%, utilizando como inductor IPTG. (A) C1: MPM., C2: Muestra sin IPTG a las 0 h., C3: Muestra con IPTG 0.4 mM a las 0 h., C4: Muestra con IPTG 0.8 mM a las 0 h., C5: Muestra sin IPTG a las 2 h., C6: Muestra con IPTG 0.4 M a las 2 h., C7: Muestra con IPTG 0.8 mM a las 2 h. (B) C8: MPM., C9: Muestra sin IPTG a las 4 h., C10: Muestra con IPTG 0.4 mM a las 4 h., C11: Muestra con IPTG 0.8 mM a las 4 h., C12: Muestra sin IPTG a las 8 h., C13: Muestra con IPTG 0.4 mM a las 8 h., C14: Muestra con IPTG 0.8 mM a las 8 h. Proteína de interés (←).

Analizando los geles mostrados en la figura 16, claramente se distingue una banda en los carriles correspondientes a las células con inductor, la cual no aparece en el carril de células sin inducir. Para asegurar que la banda corresponde al péptido de 3 UR también se realizó un Western-Blot para su identificación aprovechando nuevamente el reconocimiento del anticuerpo α -His hacia el tallo de histidinas fusionado a las 3 UR (Fig. 17), en este caso solo se analizó la muestra correspondiente a 8 h de inducción y 0.4 mM de IPTG, ya que en el gel la banda se observa con mayor intensidad que en el caso de las de 4 h de inducción, pero no se alcanza a observar diferencia respecto a la de 8 h con 0.8 mM de IPTG.

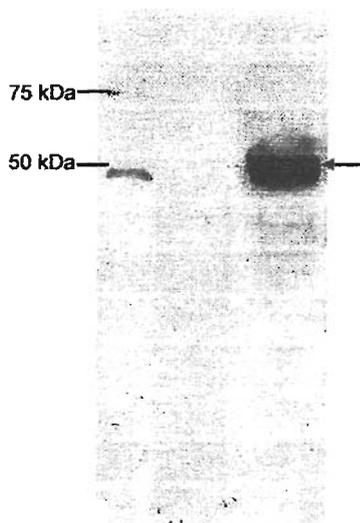


Fig. 17: Western-Blot del péptido 3UR a 8 h de su inducción con IPTG. C1: MPM. 6xHis (Qiagen), C3: 3UR con IPTG 0.4 mM en XL10-Gold. Proteína de interés (\leftarrow).

Las condiciones establecidas para la expresión del péptido 3 UR en *E. coli* XL10 fueron 8 h de inducción con IPTG a una concentración de 0.4 mM.

Purificación de 2 y 3 UR.

El tallo de histidinas que se fusiona a la proteína de interés no solo sirve para poder identificar al péptido, también le confiere a la proteína afinidad por ciertos iones metálicos

bivalentes como Zn^{2+} , Cu^{2+} o Ni^{2+} , debido a las interacciones que se pueden formar entre estos iones y los anillos imidazólicos de las histidinas se puede purificar al péptido mediante cromatografía de afinidad a metal.

Por tanto se preparó una columna de sefarosa niquelada la cual tiene una capacidad de unión de 5 mg de proteína/mL de sefarosa, la columna se equilibrio con tampón de fosfatos pH 7.4 con imidazol a una concentración de 0.05 M (tampón de adsorción), a estas condiciones el péptido se adsorbe a la columna permitiendo eliminar mediante lavados el resto de las proteínas, a continuación se eluye al péptido por competencia utilizando el mismo tampón pH 7.4 pero a una concentración de imidazol 0.25 M (tampón de elución).

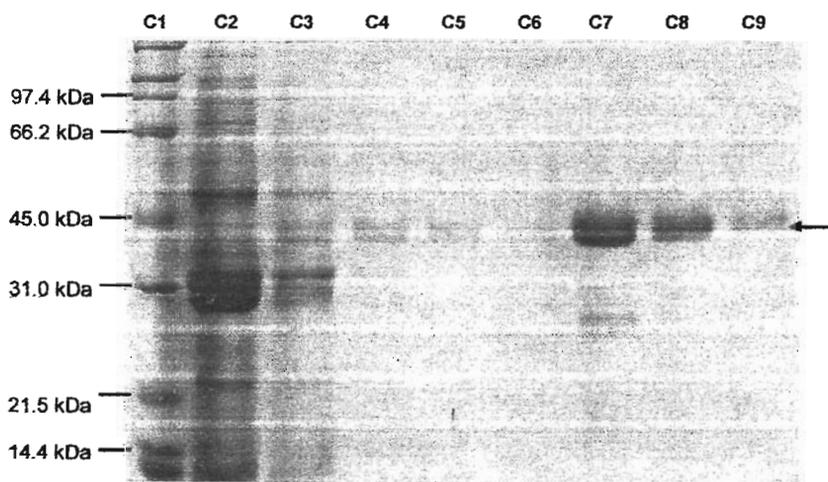


Fig. 18: Análisis del ensayo de purificación de 2 UR en gel SDS-PAGE al 10% C1: MPM., C2: Proteína no adsorbida a la columna., C3 – C6: Lavados de la columna C7-9: Elución del péptido 2 UR. Proteína de interés (←).

Como se puede observar en la figura 18, la purificación del péptido fue parcial ya que en las eluciones se observa una banda debajo de las 2 UR. Se decidió entonces por cambiar el pH del tampón de adsorción de 7.4 a 5.0 para equilibrar la columna y realizar los primeros cinco lavados, subsecuentemente se realizaron lavados con buffer de adsorción pH 7.4 para luego eluir a la proteína con el tampón de elución, obteniéndose finalmente la proteína pura (Fig. 19).

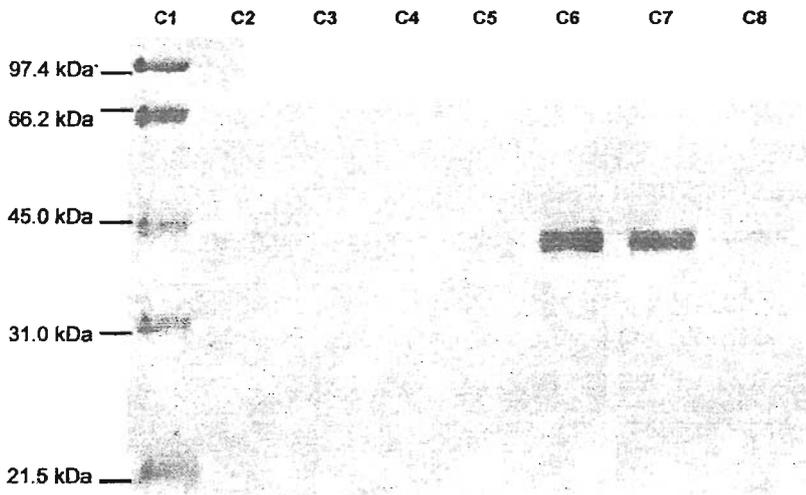


Fig. 19: Gel SDS-PAGE al 10% donde se muestra en el sexto carril al péptido 2 UR purificado utilizando tampón de elusión pH 7.4 y lavados a pH 5.0 (C2-C5) de la columna de sefarosa niquelada.

Para purificar las 3 UR, se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para poder purificar a las 2 UR, la proteína obtenida se observa en la figura 20.

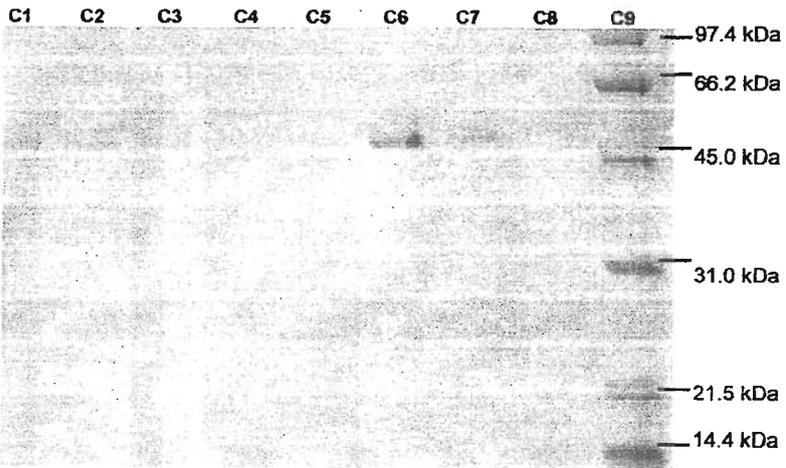


Fig. 20: Gel SDS-PAGE al 10% donde se muestra en el sexto carril al péptido 3 UR purificado utilizando tampón de elusión pH 7.4 y lavados a pH 5.0 de la columna de sefarosa niquelada.

Ensayos de adsorción

Una vez que se tuvieron puras las 2 y 3 UR, se dializaron contra buffer citratos-fosfatos pH 5.0 para eliminar el imidazol presente en las eluciones y se concentraron los péptidos, el de 2 UR mediante diálisis inversa y el de 3 UR utilizando un SpeedVac, la determinación de la cantidad de proteína se efectuó midiendo absorbancia a 280 nm, y conociendo los coeficientes de extinción molar (ϵ) de ambos péptidos $\epsilon_{2UR} = 45090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{3UR} = 59740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, se estableció la cantidad total de proteína.

Los ensayos de adsorción al sustrato insoluble se realizaron utilizando concentraciones crecientes de los péptidos en una suspensión de almidón de maíz en buffer de citratos-fosfatos pH 5.0 a 4°C con media hora de incubación. Se tomaron lecturas por triplicado de 11 muestras diferentes para cada ensayo, y se determinó la cantidad de proteína que se adsorbe al almidón insoluble mediante diferencia entre la proteína presente en las muestras sin almidón (blancos) y la cantidad de proteína presente en el sobrenadante de las muestras con almidón (Tablas 3 y 4).

2 UR				2UR-bis			
Prot inicial Po (mg/mL)	Prot no ads Pna (mg/mL)	Prot ads Po-Pna	pr ads/mg almidón (mg/mg)	Prot inicial Po (mg/mL)	Prot no ads Pna (mg/mL)	Prot. ads Po-Pna	pr ads/mg almidón (mg/mg)
3.849	2.590	1.259	2.098	5.494	4.132	1.363	2.271
3.228	2.431	0.797	1.329	4.791	3.422	1.369	2.282
2.628	1.975	0.653	1.088	4.061	2.926	1.135	1.891
2.213	1.584	0.629	1.049	3.560	2.718	0.842	1.403
1.685	1.128	0.557	0.929	2.618	2.075	0.543	0.905
1.297	0.794	0.503	0.839	1.938	1.478	0.460	0.767
1.042	0.719	0.323	0.538	1.616	1.099	0.516	0.861
0.916	0.520	0.396	0.660	1.098	0.655	0.443	0.739
0.610	0.201	0.409	0.682	0.571	0.480	0.091	0.151
0.338	0.071	0.268	0.446	0.216	0.197	0.019	0.031
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 3: Datos obtenidos del ensayo de adsorción de 2UR de la α -amilasa de *L. amylovorus* sobre almidón insoluble. El ensayo se realizo por duplicado.

3 UR				3UR-bis			
Prot inicial Po (mg/mL)	Prot no ads Pna (mg/mL)	Prot ads Po-Pna	Pr ads/mg almidón (mg/mg)	Prot inicial Po (mg/mL)	Prot no ads Pna (mg/mL)	Prot. ads Po-Pna	Pr ads/mg almidón (mg/mg)
10.682	6.282	4.400	7.334	11.765	7.035	4.730	7.883
9.389	5.553	3.836	6.393	10.543	6.130	4.413	7.355
7.882	3.487	4.395	7.324	8.944	4.711	4.233	7.055
6.388	2.596	3.793	6.321	7.743	3.412	4.330	7.217
4.901	1.564	3.338	5.563	6.171	2.148	4.023	6.706
3.741	0.993	2.747	4.579	5.007	1.376	3.631	6.051
2.936	0.638	2.298	3.830	3.303	0.717	2.585	4.309
2.346	0.466	1.879	3.132	2.403	0.387	2.016	3.360
1.531	0.122	1.409	2.348	1.626	0.149	1.477	2.461
0.872	0.000	0.872	1.454	0.781	0.000	0.781	1.301
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 4: Datos obtenidos del ensayo de adsorción de 3UR de la α -amilasa de *L. amylovorus* sobre almidón insoluble. El ensayo se realizo por duplicado.

Con los datos que se obtuvieron se elaboraron dos gráficos. El primero corresponde a la cantidad de proteína adsorbida al almidón contra la cantidad de proteína libre (proteína no adsorbida) en el equilibrio (Gráfico 1), en el se observa que conforme se aumenta el número de UR's se presenta un incremento en la pendiente de las isotermas de adsorción y en el caso específico de las 3UR y el DFA completo se encontró que cuando la concentración de proteína es baja toda ella se adsorbe al gránulo de almidón (fase sólida) sin que exista proteína libre en la fase líquida, posteriormente se presenta un cambio en la pendiente que corresponde a la presencia de proteína libre debido a la saturación del gránulo al aumentar la proteína añadida.

El segundo gráfico relaciona a la cantidad de proteína adsorbida al almidón contra la cantidad de proteína añadida inicialmente en el equilibrio (Gráfico 2), este segundo gráfico nos permite obtener las constantes de adsorción (K_{ad}) [56], estas constantes muestran que en un principio, al comparar una con dos unidades repetidas hay un incremento de aproximadamente 150% en la capacidad de adsorción, mientras que al aumentar de 2UR a 3UR el incremento es de aproximadamente 100%, pero al comparar 3UR con 5UR el aumento en la capacidad de adsorción es solo de aproximadamente el 20% a pesar de que se presentan dos unidades repetidas de más entre el DFA completo y las 3UR. Es de importancia señalar que la K_{ad} de la α -amilasa completa es muy similar a la de 2UR y por

tanto también es diferente a la K_{ad} de las 5UR, lo que sugiere que la amilasa no usa todas sus UR para fijarse al almidón.

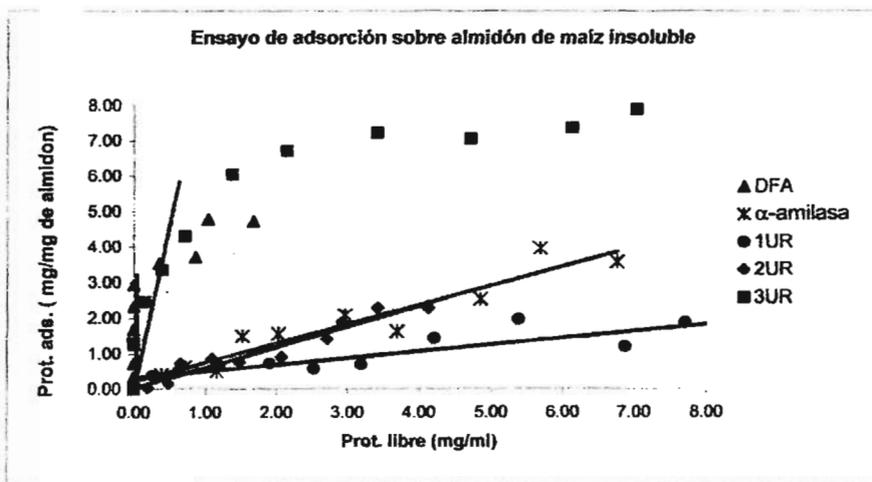


Gráfico 1: Adsorción de las proteínas purificadas (1, 2, 3UR, DFA y la α -amilasa completa) sobre almidón insoluble. Las curvas se obtuvieron graficando la cantidad de proteína adsorbida (fase sólida) contra la cantidad de proteína libre (fase líquida) en el equilibrio. Datos de DFA, α -amilasa y 1UR tomados de [14].

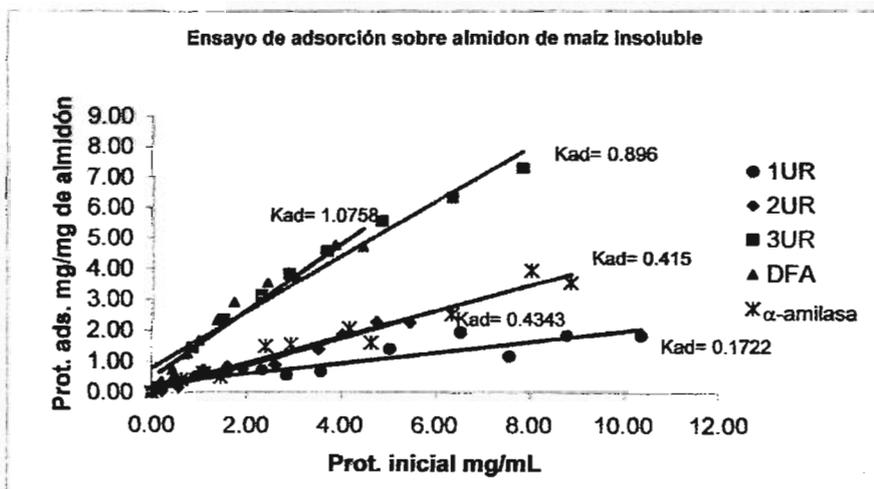


Gráfico 2: Isotermas de adsorción lineales de las proteínas correspondientes a 1, 2, 3 UR, DFA y la α -amilasa completa. Las curvas se obtuvieron graficando a la proteína adsorbida (fase sólida) contra la proteína inicialmente añadida (fase líquida) en el equilibrio. Datos de DFA, α -amilasa y 1UR tomados de [14].

Discusión:

Peso molecular de las proteínas:

La talla calculada por secuencia para las proteínas de 2UR y 3UR es de 26.9 kDa y 36.5 kDa respectivamente, sin embargo en los geles de expresión y purificación ambas proteínas migran por arriba de estas tallas. Este fenómeno se ha observado en proteínas fusionadas a tallos de histidinas, ya que en el sistema SDS-PAGE las proteínas adquieren una carga negativa al unirse al SDS en una relación aproximada de 1.4mg de SDS/mg de proteína lo que da un radio constante de carga/masa [57]. Como el tallo de seis histidinas posee carga positiva, la relación carga/masa puede verse afectada y por tanto alterarse la movilidad electroforética de la proteína.

Por otra parte, se ha observado en geles de poliacrilamida, que algunas amilasas de lactobacilos tienden a migrar por arriba de su masa molecular calculada, por ejemplo el peso molecular de la proteína codificada por el gen *amyA* de *L. manihottivorans* es de 98.4 kDa [11] mientras que el de la proteína purificada corresponde a 135 kDa [45]. Las mismas discrepancias en la estimación de la talla han sido observadas en las amilasas de *L. amylovorus* y *L. plantarum* A6 [10] sin que se haya podido explicar hasta el momento a que se deben estas diferencias.

Adsorción al sustrato:

El DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* tiene una estructura diferente a las reportadas ya que se encuentra formado por una serie de 5 unidades repetidas directas e idénticas, cada una formada por 91 aminoácidos; como se explicó la talla de una UR es muy similar al tamaño reportado para otros DFA's. Por otro lado se sabe que el DFA aislado del resto de la enzima así como una sola UR son capaces de adsorberse al almidón insoluble aunque sus constantes de adsorción son diferentes entre sí ($1.07 [S]^{-1}$ para el DFA y $0.17 [S]^{-1}$ en el caso de 1UR) y distintas a la constante de adsorción de la α -amilasa completa ($0.41 [S]^{-1}$) (Gráficos 1 y 2). Se compararon estos datos con los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción sobre almidón insoluble de dos y tres UR y se observa que el péptido que

corresponde a 2UR presentan una K_{ad} de $0.434 [S]^{-1}$, la cual es muy similar a la K_{ad} de la α -amilasa completa de *L. amylovorus* que es de $0.415 [S]^{-1}$ (Gráfico 2). Estos datos sugieren que la α -amilasa podría utilizar solo dos de las cinco UR que conforman el DFA para adsorberse al gránulo de almidón, mientras que el resto de las UR no interactúa con el sustrato posiblemente por impedimento estérico debido a la presencia del dominio catalítico de la enzima.

En el caso de la proteína correspondiente a tres UR, su K_{ad} ($0.81 [S]^{-1}$) es mayor que la de la α -amilasa y consecuentemente que una ($0.17 [S]^{-1}$) y dos UR ($0.43 [S]^{-1}$) (Gráficos 1 y 2). Este aumento en la constante de adsorción de las proteínas cuando se tienen varias UR, comparado con la constante de adsorción de la UR aislada, sugiere un probable efecto cooperativo por parte de las UR, efecto que ha sido reportado en otras glucosido hidrolasas con MUC múltiples como es el caso de la xilanasasa 11A de *Cellulomonas fimi* que posee dos MUC pertenecientes a la familia 2b de los módulos de unión a carbohidratos y que juntos presentan mayor afinidad por el sustrato que de manera individual [58].

Por otra parte, al observar el gráfico 1 se aprecia que las 5 UR se adsorben completamente al gránulo hasta una concentración de 3 mg/mg de almidón momento en el que se aprecia un cambio en la pendiente de la curva de adsorción, y en el caso de las 3 UR se adsorben completamente hasta una concentración aproximada de 2.5 mg/mg de almidón que es donde se aprecia un cambio en la pendiente de la curva; a diferencia de 1UR, 2UR y de la amilasa completa que siguen una tendencia lineal y no se alcanza a apreciar una saturación del sustrato, probablemente porque la interacción con el almidón es más débil y eso podría permitir mayor intercambio molecular.

Posible papel de las UR

Con los resultados obtenidos en este trabajo y comparando con otros sistemas descritos se podría pensar que si en la α -amilasa se presentan 5URs y aparentemente sólo dos interactúan directamente con el sustrato entonces las UR restantes podrían o deberían tener otra función que favorezca la adsorción o la hidrólisis del almidón insoluble. En el caso particular de la glucoamilasa I (GAI) de *Aspergillus awamori* var. *kawachi* la región con

afinidad por el almidón insoluble puede ser dividida en dos partes: la región Cp que es propiamente el dominio de fijación al almidón y la región Gp-I que esta localizada entre el dominio catalítico y el DFA y que se encuentra compuesta principalmente de residuos de treonina y serina unidos a moléculas cortas de manósidos. Gp-I es una región espaciadora que posiciona a los dominios catalíticos y de adsorción en el sustrato, además de encontrarse involucrada en la conservación estructural de la GAI ante el estrés, en su adsorción a gránulos de almidón y en secreción [59]. Respecto a la α -amilasa de *L. amylovorus* las UR que no interactúen con el sustrato pueden estar cumpliendo una función similar a la de la región Gp-I de la GAI, que en este caso sería la función de espaciadores entre las dos UR que si se están adsorbiendo.

Otra posibilidad sería que las UR del DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* que no se adsorben al sustrato ejercieran una función quelante atrapando cadenas cortas de maltooligosacáridos producto de la hidrólisis, las cuales pudieran unirse a las UR efectivas y afectar al fenómeno de adsorción. En otras glucósido hidrolasas con múltiples módulos de unión a carbohidratos (MUC) como la xilanasa de *Clostridium stercoarium* cepa NCIB11754 ha sido sugerido que los MUC tienen la habilidad de secuestrar cadenas solubles de xilooligosacáridos manteniéndolas en proximidad al sitio catalítico y favoreciendo la hidrólisis del sustrato [60].

Sitios de Unión:

Se ha establecido que el dominio de fijación al almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* presenta dos sitios de unión a maltosa: el sitio uno en el cual los residuos de aminoácidos que interaccionan directamente con el sustrato son Trp 543 y Trp 590 y el sitio dos en el que los residuos de aminoácidos que interaccionan directamente con el sustrato son Tyr527 y Tyr556, además de estos, existen residuos importantes para la adsorción pero que no interaccionan de manera directa con el sustrato [27]. Cuando se compara una UR de la α -amilasa de *L. amylovorus* con el DFA de la glucoamilasa de *A. niger* y con el DFA de otras enzimas (Fig. 21) se observa que la UR presenta ciertos residuos que han sido clasificados como importantes para llevar a cabo la adsorción.

```

          543          556          590
          |          |          |
          1          1          1          22222  22          2          1  1          11  1
A.nig. YLVGSISQLGDMETSQSDGIALSADNQTSQSDPL----WYVTVTLQPAGESFEYKQFIRIESDDSVQEEQSDPNREYQT
L.amy. KKVYFEKQPSSVQGSRVYAYVYN-KQNTN---KAITSAW---PGKK-MTALGNDKYELDLTD-EDDSDLAVIQFT
B.sub. AKTIGYQNPQNHQ-SQVNAYIY--KHDGSRVIELTGSW---PGKP-MTKNADGIYTLTLPADTDTTNAK-VIQFN

```

Fig.21 Las enzimas del alineamiento son: Glucoamilasa de *Aspergillus niger* (P00691), α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (Q48502) y α -amilasa de *Bacillus subtilis* (P00691). Resaltados en negro se encuentran los residuos que interaccionan directamente con el sustrato, en negritas se presentan residuos catalogados como importantes para la adsorción. Los números en negritas representan a los residuos presentes en los sitios de unión 1 y 2 de la glucoamilasa de *A. niger*.

Sin embargo en una UR no se encuentran los sitios de unión completos, pues aunque encontramos aminoácidos aromáticos que pueden interaccionar con el sustrato, carece de la mayoría de los residuos que los conforman, posiblemente la presencia de un mayor número de UR favorezca la interacción de otros residuos aromáticos con el sustrato o bien se complete o forme un nuevo sitio de unión, el cual contribuye a que la capacidad de adsorción de la proteína aumente.

Conclusiones:

- Las proteínas correspondientes a 2 UR y 3 UR son capaces de adsorberse al gránulo de almidón insoluble.
- La α -amilasa de *L. amylovorus* se adsorbe en igual medida que el péptido correspondiente a las 2 UR, lo que nos lleva a pensar que la α -amilasa completa solo utiliza dos de sus cinco subdominios de fijación para adsorberse al almidón insoluble.
- Conforme se aumenta el número de UR's se aumenta la capacidad de unión de la proteína por lo que se está presentando un efecto cooperativo entre las UR's en el fenómeno de adsorción.

Referencias:

- [1] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R., (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135-152.
- [2] Sen, S. and Chakrabarty, S.L., (1984). Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J. Ferment. Technol.* 62: 407-413.
- [3] Agati, V., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D. J., (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented doughs (mawè and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85: 512-520.
- [4] Nakamura, L. K. and Crowell, C. D., (1979). *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentation. *Development In Industrial Microbiology.* 20: 535-540.
- [5] Bohak, I., Back, W., Richter, L., Eirman, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., (1998). *Lactobacillus amyloliticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 360-364.
- [6] Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B. and Raimbault, M., (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 36: 379-383.
- [7] Nakamura, L. K., (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch hydrolysing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31: 56-63.
- [8] Morlon-Guyot, J., Guyot, J. P., Pot, B., Jacobè de Haut, I. and Raimbault, M., (1997). *L. manihotivorans* sp. nov. a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1101-1109.
- [9] Janeček, Š., Ševčík, J., (1999). The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett.* 456: 119-125.
- [10] Giraud, E. and Cuny, G., (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene* 198: 149-157.
- [11] Morlon-Guyot, J., Mucciolo-Roux, F., Rodríguez-Sanoja, R. and Guyot, J.P., (2001). Characterization of the *L. manihotivorans* α -amylase gene. *DNA Seq.* 12: 27-37.
- [12] Warren, R. A. J., (1996). Microbial Hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 183-212.
- [13] Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J. N. Juge and Guyot, J. P., (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3350-3356.
- [14] Santiago, M., Linares, L., Sanchez, S. and Rodríguez-Sanoja, R. (2005). Functional characteristics of the *Lactobacillus amylovorus* α -amylase starch binding domain. *Biologia Bratislava.* In press.
- [15] van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotech.* 94:137-155.
- [16] Smith, A. M., Denyer, K., and Martin, C., (1997). The synthesis of the starch granule. *Plant Mol. Biol.* 48: 67-87.

- [17] Jenkins, P.J., Cameron, R. E. and Donald, A.M., (1993). A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch* 45: 417-420.
- [18] Hizukury S., (1986). Polymodal distribution of the chain length of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* 147: 342-347.
- [19] Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet B., Mouille, C., D'Hulst, C., Kossmann, J. and Ball, S., (1997). Starches from A to C. *Chlamydomonas reinhardtii* as a Model Microbial System to Investigate the Biosynthesis of the Plant Amylopectin Crystal. 115: 949-957.
- [20] French, D., (1984) Organization of starch granules. *Starch: Chemistry and Technology*, ed. RL Whistler, JN BeMiller, EF Paschall, pp 183-247. Orlando: Academic.
- [21] MacGregor, E. A., Janeček, Š. and Svensson, B., (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1546: 1-20.
- [22] Banner, D. W., Bloomer, A.C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. D., Priddle, J. D. and Waley, S.G., (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature.* 255: 609-614.
- [23] Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R. and Svensson, B. (1991) Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* 80: 51-55.
- [24] Abe, A., Tono-zuka, T., Sakano, Y. and Kamitori S., (2004). Complex Structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase I with Malto-oligosaccharides Demonstrate the Role of Domain N Acting as a Starch-Binding Domain. *J. Mol. Biol.* 335: 811-822
- [25] Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S. and Davies, G. J., (1999). X-ray structure of Novamyl, the five domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry.* 38: 8385-8392.
- [26] Janeček, Š., Svensson, B. and MacGregor E. A., (2003). Relation between domain evolution, specificity and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 270: 635-645.
- [27] Sorimachi, K., Le Gal-Coëffet, M., Williamson, G., Archer, D. B. and Williamson M. P., (1997). Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Structure.* 5: 647-661.
- [28] Henrissat, B., (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-3016.
- [29] Henrissat, B., Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7: 637-644.
- [30] Svensson, B., Tovborg Jensen, M., Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Bønsager, B., Nielsen, P. K., Kramhøft, B., Prætorius-Ibba, M., Nøhr, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. and Drigues, H. (2002). Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biol. Brat. 57/Suppl.* 11: 5-19.
- [31] Rodríguez-Sanoja, R., Oviedo, N. Sánchez, S. (2005). Microbial Starch-binding domain. *Curr. Opin. Microbiol.* Vol. 8. In press.
- [32] Davies, G. and Henrissat, B., (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3: 853-859.

- [33] Matsuura, Y. (2002). A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of the α -amylase family. *Biol. Brat.* 57/Suppl. 11: 21-27.
- [34] Nakajima, R., Imanaka, T. and Aiba, S., (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 355-360.
- [35] Janeček, Š., (2002). How many conserved sequence regions are there in the α -amylase family? *Biologia, Bratislava.* 11: 29-41.
- [36] Black, G. W., Hazeelwood, G. P., Millward-Sadler, S. J., Laurie, J. I. and Gilbert, H. J. (1995). A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem. J.* 307: 191-195.
- [37] Din, N., Gilkes, N. R., Tekant, B., Miller, R. C. Jr., Warren, R. A. J. and Kilburn, D. G., (1991). Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of bacterial cellulase. *Bio/Technol.* 9: 1096-1100.
- [38] Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H. J., Williamson, G. and Williamson, M. P., (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Letters.* 447: 58-60.
- [39] Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J. E., Boraston, A., Hazlewood, G. P. and Gilbert, H. J., (1998). *Pseudomonas* cellulose binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* 331: 775-781.
- [40] Bhosale, S. H., Rao, M. B. and Deshpande, V. V., (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60, 280-300.
- [41] Desmazeud, M. J. et Roisart, H. (1994). *Metabolisme general des bactéries lactiques*. In: Roissart, H. et Luquet, F. M. (Cordonnateurs) *Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. Volume 1. Loriga. France.
- [42] Steinkraus, K. H., (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [43] Castillo, P. C., Suarez, G. M., Gasparian, S. and Morlon-Guyot, J., (1993). Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 266-259.
- [44] Giraud, E., (1993). *Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de Lactobacillus plantarum amylolytique isolée du manioc fermenté*. Thèse. Université de Provence, Aix-Marseille I. France.
- [45] Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J. P., (2000). Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzym. Microb. Technol.* 27: 406-413.
- [46] Giraud, E., Champeiller, A. and Raimbault, M., (1994). Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4319-4323.
- [47] Imam, S., Burgess-Cassler, A., Cote, G. L., Gordon, S. H. and Baker, F. L., (1991). A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight α -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Curr. Microbiol.* 22: 365-370.
- [48] Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J. P. and Sanchez, S. (2005). Starch-Binding Domain Affects Catalysis in Two *Lactobacillus* α -amylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 297-302.

- [49] Sumitani, J., Tottori, T., Kawaguchi, T. and Arai, M., (2000). New type of starch-binding domain: the repeat motif in the C-terminal region on *Bacillus* sp. No. 195 α -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochem. J.* 350: 477-484.
- [50] Janeček, Š., Svensson, B. and Russell, R. R. B., (2000). Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiology Letters* 192: 53-57.
- [51] Wren, B. W., (1991). A family of clostridial and streptococcal ligand-binding protein with conserved C-terminal repeat sequences. *Molecular Microbiology*. 5(4): 797-803.
- [52] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., (1998). *Molecular Cloning. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory press.
- [53] Rodríguez-Sanoja, R., (2001). Contribution à l'étude des relations structure-fonction des α -amylases de lactobacilles. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en sciences des aliments. Université de Montpellier II.
- [54] Ausubel, F. E., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. K., (1994). *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley and Sons, Inc. Massachusetts, E. U. A.
- [55] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [56] Chen, L., Coutinho, P. M., Nikolov, Z. and Ford, C. (1995). Deletion analysis of the starch binding-domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein. Eng.* 8: 1049-1055.
- [57] Lehninger, A. *Bioquímica. 2da edición.* Ed. Ediciones Omega, S.A. 1983. pp. 185.
- [58] Bolam, D. N., Xie, H., White, P., Simpson, P. J., Hancock, S. M., Williamson, M. P., Gilbert, H. J., (2001). Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochem.* 40(8):2468-77.
- [59] Semimaru, T., Goto, M., Furukawa, K. and Hayashida, S., (1995). Functional analysis of the threonine and serine rich Gp-I domain of glucoamylase I from *Aspergillus awamori* var. *kavachi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2885-2890.
- [60] Boraston, A. B., McLean, B. W., Chen, G., Li, A., Warren, R. A., Kilburn, D. G., (2002). Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase. *Mol Microbiol.* 43(1):187-94.
- [61] Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J. L. (1998). Transformation of bacteria by electroporation. *TIBTECH.* 6: 303-309.

APÉNDICES:

I. Medios de cultivo.

I.A Medio Luria-Bertani.

Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

I.B Medio SOC.

Triptona	20 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	0.5845 g/L
KCl	0.185 g/L
MgCl ₂ -6H ₂ O	2.03 g/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	2.46 g/L
Glucosa	3.60 g/L

II. Protocolos para ADN.

II.A Extracción de plásmido a pequeña escala (miniprep).

1. Se inoculan 5 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se transfiere el medio de cultivo a tubos de 1.5 mL y se centrifuga a 12000 rpm por 5 min. a una temperatura de 4°C.
3. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón celular en 100µL de la solución I, en seguida se adicionan 200µL de solución II y se mezclan por inversión cuidando de abarcar toda la superficie del tubo, posteriormente se agregan 150µL solución III y se vortexea gentilmente el tubo en posición invertida durante 10 s. Se deja reposar el tubo en hielo de 3 a 5 min.
4. Al sobrenadante se le adicionan dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja a -20°C por 30 min. y se centrifuga a 12000 rpm por 15 min. a 4°C.

5. Se retira el sobrenadante y se agrega al botón 1 volumen de etanol al 70% a R.T. hasta que se desprenda del fondo del tubo, después se centrifuga a 12000 rpm por 15 min. a 4°C.
6. El sobrenadante es retirado y se deja secar el botón a 37°C, por último se resuspende el botón en 10µL de TE (pH 8.0), conteniendo RNAasa (20µg/mL), y se incuba a 55°C por 30 min.

Solución I	Solución II	Solución III
50mM Glucosa	0.2 NaOH	5M CH ₃ COOK 60mL
25mM Tris-HCl pH 8	1% SDS	CH ₃ COOH 11.5mL
10mM EDTA pH 8		H ₂ O 28.5mL

II.B Extracción de plásmido a gran escala (maxiprep).

1. Como preinóculo se siembran 5mL de medio LB-amp al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se inoculan 250mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
3. Se transfiere el medio de cultivo a botellas de 250mL y se centrifugan a 10000 rpm por 10 min. a 4°C. El sobrenadante se retira y el botón se mantiene en hielo.
4. El botón se resuspende en 30 mL de solución I adicionando 250µL de RNAasa (10mg/mL), posteriormente se agregan 60 mL de solución II se mezcla bien y en seguida se añaden 50 mL de solución III. La mezcla se centrifuga a 12000 rpm 30 min. a 20°C.
5. El sobrenadante se recupera, y se le añade un volumen de isopropanol para precipitar el ADN, la muestra se deja reposar 30min y después se centrifuga a 12000rpm 30min a 20°C
6. Se retira el sobrenadante, y posteriormente se lava el botón en etanol al 70%, centrifugar a 12000rpm 15min a 20°C y el etanol al 70% se retira y se deja secar el botón a 37°C por 30min-1h.
7. El botón se resuspende en 5mL de Sol. MOPS, agregando 100µL de RNAasa pancreática (10mg/mL) dejándolo reposar 1 hora a temperatura ambiente, consecutivamente se adicionan 10µL de proteinasa K (20mg/mL) e incubar a 55°C 1hora (opcional).

<i>Solución I</i>	<i>Solución II</i>	<i>Solución III</i>	<i>Solución de MOPS</i>
5mM sacarosa 10mM EDTA 25mM Tris pH 8.0	0.2N NaOH 1%(w/v) SDS	3M acetato de sodio pH 4.8	50mM MOPS pH 7.0 750mM NaCl 2mM EDTA

II.C Limpieza de ADN con fenol-cloroformo

1. Se colocan 0.5 mL de ADN en tubos eppendorf, adicionando 0.5 mL de fenol-cloroformo 1:1 a la muestra y se agita hasta que se forme una suspensión.
2. Se centrifuga 5 min. a 13000 rpm y posteriormente se recupera la fase acuosa.
3. El paso 1y 2 se repiten hasta que se halla eliminado el exceso de proteína que se acumula entre las dos fases.
4. Se agregan 0.5 mL de cloroformo isoamílico 24:1, agitando para que se forme la suspensión y se centrifuga 3 min. a 13000 rpm.
5. La fase acuosa se recupera y se le añade un décimo de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla para homogenizar.
6. Se deja precipitar el ADN a -20°C durante 1 hora, a continuación se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante es eliminado.
7. El botón se lava con 0.25 mL de etanol al 70% hasta que se despenda del tubo eppendorf, se centrifuga 15 min a 13000 rpm y se retira el sobrenadante.
8. Se deja secar el botón a 37°C y se resuspende en un volumen adecuado de agua estéril o buffer TE (pH 8.0).

II.D Purificación de plásmido Mini Kit (Qiagen)

Permite la purificación de ADN usando columnas de gravedad donde la purificación del ADN plásmidico se lleva acabo por intercambio aniónico. Las propiedades del ADN purificado son equivalentes o superiores a los que se obtienen por gradiente de CsCl, además de que no se utilizan sustancias toxicas como el fenol, cloroformo, bromuro de etidio y CsCl. Este método solo se utiliza para purificar el ADN que se secuenció.

1. Se reparte la muestra (ADN plasmídico) en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifuga 10 segundos a 12000rpm, después se guarda una alícuota de 50 μ L de muestra para su posterior análisis.
2. A continuación el tip (columna de gravedad) es equilibrado con 1mL de tampón QBT, y después se hace pasar por la columna la muestra ADN plasmídico, una vez que la muestra ya pasó se guarda una alícuota de 50 μ L de muestra.
3. La columna se lava 4 veces con 1mL de tampón QC (este se recupera y guarda en tubos eppendorf).
4. Se pone 0.8mL de tampón QF (incubado previamente a 65°C antes de la elusión) y se recupera el ADN eluido en tubos eppendorf y se guarda una alícuota de 50 μ L.
5. Se precipita el ADN con 700 μ L de isopropanol, dejándolo reposar 30 min y después se centrifuga a 12000rpm 15 min. a temperatura ambiente.
6. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón en 100 μ L de Etanol 70% y se centrifuga 15 min a 12000 rpm.
7. El botón se dejar secar a temperatura ambiente ó a 37°C durante 1h y por ultimo se resuspende cada botón en 20 μ L de agua ultra pura estéril.

II.E Electroforesis de Agarosa

En la electroforesis se permite la migración de ADN (cuya carga es negativa por la presencia de grupos fosfato) a través de un gel de agarosa y que migra del polo negativo al polo positivo como resultado del campo eléctrico formado entre los electrodos sumergidos en el medio. El ADN migra con respecto a su peso molecular y de esta manera se puede identificar el estado del ADN y peso molecular.

1. Se prepara una solución de agarosa 0.8% en el buffer TAE, la solución se calienta para que se disuelva, sin dejar agregados suspendidos, posteriormente se adiciona el bromuro de etidio a una concentración final de (0.5 μ g/mL).
2. Se coloca la solución en la cámara de electroforesis y se deja que solidifique.
3. La muestra de ADN se mezcla con tampón de carga a una concentración final 1X, y esta es colocada en el gel.

4. La electroforesis se lleva a cabo a 6 v/cm hasta que el pigmento haya migrado a $\frac{3}{4}$ partes a lo largo del gel y después se puede observar en el transiluminador de UV para examinar la migración de fragmentos de ADN y su peso molecular.

Reactivos:

Agarosa

Buffer TAE (Tris. acetatos-EDTA) 50X:

Buffer de carga 6X Tipo III:

- 245 gr Tris base

- 0.25% azul de bromofenol

- 57.1 mL ácido acético glacial

- 0.25% Cianol FF de xileno 4°C

- 100 mL EDTA 0.5M (pH 8.0)

- 30% glicerol en agua

II.F Producción de células de *Escherichia coli* electrocompetentes.

La utilización de la electroporación para la transformación de cepas de *E. coli* permite incrementar la introducción de plásmidos a la bacteria. La electrotransformación o electroporación es un proceso en el que las células son sometidas a un campo eléctrico que las hace permeables al ADN. Se postula que en los campos eléctricos de baja intensidad, las membranas de las células se polarizan y que los cambios de campo inducen a un potencial de membrana de 200-400 mv, a partir de áreas de desorganización reversible que se van a producir. La ruptura transitoria de membranas la torna permeable a macromoléculas [61].

Preparación de células electrocompetentes.

1. Se inocula 400mL de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37°C con agitación continua por 3 hrs. hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a 10000rpm por 15min a 4°C.
3. Se retira el sobrenadante (medio) y resuspende el botón en un volumen de agua mega pura estéril y fría, después se centrifuga como en el paso 2.
4. El sobrenadante se retira y resuspende en $\frac{1}{2}$ del volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y se centrifuga a 10000rpm a 4°C por 15min.

4. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 8mL de glicerol al 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000rpm a 4°C por 15min.
5. Por ultimo se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en un volumen final de 1.2mL de glicerol al 10% frío, se alícuota la muestra en tubos eppendorf con 50μL cada uno, almacenándolos a -70°C.

Electro-Transformación.

1. A 50μL de células competentes se les adiciona de 1-2μg de plásmido y se incuba en hielo por 1 min.
2. La mezcla de ADN y células se colocan en una cubeta de electroporación fría de 0.1cm.
3. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5ms y 12.5 kV/cm, y se le da un pulso de 1.25 V. Inmediatamente después se le adicionan 950 μL de medio SOC y rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta.
4. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y se incuban a 37°C en agitación continua por 1h, después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa.

III. Protocolos para proteínas.

III.A Geles SDS-PAGE.

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. En la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel; el tamaño de los poros disminuye con altas concentraciones de acrilamida. La combinación del tamaño del poro del gel y la carga de la proteína, tamaño y forma determinan el tipo de migración de la proteína.

SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS está cargado negativamente. En este sistema las proteínas tienen carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema.

a) Preparación del gel:

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, se marcan los niveles de separación de los geles y se comprueba de que no haya fugas.
2. Se prepara el gel de acrilamida al 12% (gel de separación) y se coloca dentro de las placas, aproximadamente abarcando 5cm de altura.
3. Para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.
4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vacía en las placas el gel de concentración, evitando que se formen burbujas dentro las separaciones y entre un gel y otro. Después de la polimerización, los geles están listos para la electroforesis.
6. Se precorren los geles 15 min. a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

b) Preparación de las muestras

1. Se colocan las muestras (en este caso botón celular) en tubos eppendorff, las células se disuelven en tampón de muestra a una concentración final de 2X y se hierven durante 5 min. Se colocan en hielo mientras son cargadas en el gel.

c) Condiciones de migración para 2 geles de acrilamida:

1. Los geles se corren a 20 mA, durante 1.5 h, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con tampón de migración 1X.

Geles de acrilamida (2) 30%/Bis:

Reactivo	Gel de Concentración	Gel de Separación
	4%	10%
Acrilamida/Bis 30%	532 µL	3.32 mL
Tris.HCl 0.5M, pH 6.8	1.0 mL	—
Tris.HCl 1.5M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10%	40 µL	100 µL
Agua destilada	2.42 mL	4 mL
Temed	4.4 µL	5.5 µL
Persulfato de amonio 10%	22 µL	55 µL
Total	4 mL	10mL

Tampón de muestra 4x:

H ₂ O destilada	8.5 mL
Tris.HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 mL
Glicerol	2 mL
SDS 10%	4 mL
2-β mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	500 µL

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Composición	Cantidad
Tri.base 125 M	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

Pasos y soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie:

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

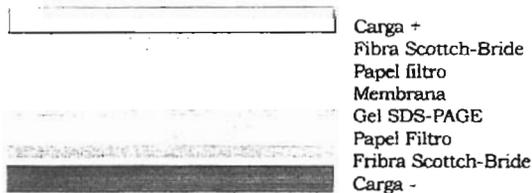
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

III.B Western Blot

En el Western-blot las proteínas son transferidas a una membrana a partir de un gel de acrilamida (SDS-PAGE) después de su separación según su talla. La inmunolocalización con anti-His permite asegurar la identidad de la proteína expresada con un tallo de histidinas y confirmar su talla por la comparación con el marcador de peso molecular que contienen 6xHis (6x Ladder, Qiagen) así como la detección de algunos productos de degradación que puedan estar presentes.

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100mL del buffer 10x + 100mL de metanol y se afora a 1 L.
2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con tampón de transferencia.
3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma:



Si al colocar la membrana sobre el gel SDS-PAGE se forman burbujas, estas deben ser eliminadas haciendo rodar una pipeta pauster sobre la superficie de la membrana.

4. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque del aparato de Western, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.
5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.
6. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3h, 1 h a 37°C o se puede guardar durante algunos días.

Reconocimiento con Anti-His

1. En caso de que no se cuente con marcador de peso molecular con tallo de histidina se sumerge la membrana en metanol para observar las proteínas transferidas, recortando la región donde se encuentra el marcador de peso molecular para ser revelado con azul de bromofenol u otra técnica similar.
2. Se prepara el tampón donde se sumergirá la membrana el cual debe tener los siguientes componentes: Tampón PBS 1x, Tween 20 0.05% y Leche descremada 3%.
3. El primer anticuerpo (anti-His) se diluye en el buffer anterior a una concentración final de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se agrega la cantidad necesaria para cubrir la superficie de la membrana. Se incuba a 15-20°C 1-1.5hrs con agitación ligera.
4. La membrana se lava por 5 min con 20 mL de tampón PBS 1x/Tween 0.05% 3 veces.
5. Se prepara el segundo anticuerpo (anti-IgG) de la misma forma que el primero, quedando a una concentración final 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incuba y se lava de igual manera.

Revelado

El revelado se realizó utilizando la actividad de fosfatasa alcalina, que ahora se encuentra acomplejada al segundo anticuerpo.

1. Se agrega 15mL de BCIP/NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina, (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21g/L y nitroazul de tetrazolio a una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/ Tris buffer) al 80%, y se deja actuar hasta que sean visibles las bandas.
7. La reacción se detiene cambiando el medio con sustrato por agua destilada.

Tampón de Transferencia 10x: 144g/L de Glicina y 30g/L de Tris base
Tampón de inmunolocalización PBS 10x (Tampón de fosfatos:0.01M+ NaCl 0.15M).
Anti-Hjs ROCHE cat. No. 1922416.
Anti-Mouse IgG (Goat), AP-Labeled NEF821 Perkin-Elmer

III.C Purificación de Proteína en columnas de afinidad

La cromatografía de afinidad inmoviliza moléculas que tienen afinidad por ligandos específicos. El aminoácido histidina presente en muchas proteínas forma complejos con iones metálicos como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Fe^{3+} ya que a pH básico este aminoácido está cargado negativamente y es esta cualidad la que se utiliza para purificar proteínas con tallo de histidinas.

La purificación de proteínas recombinantes fusionada a 6 histidinas consiste en cuatro pasos: lisis celular, unión de la proteína a la columna, lavados, y elución (Fig. 22)

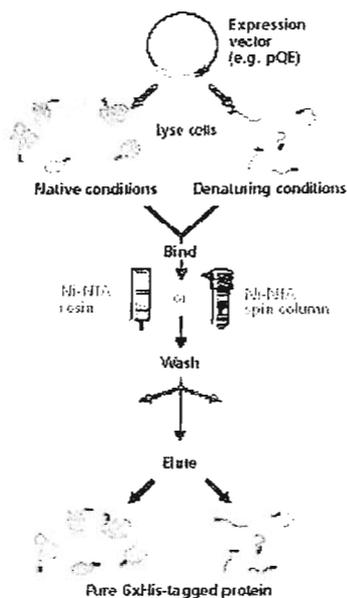


Fig. 22: Diagrama de purificación de las proteínas con tallo de histidinas fusionado

Preparación de la columna sefarosa niquelada

1. Se agitar el contenedor de la sefarosa para resuspender el gel, se toman 250 μL de sefarosa y se colocan en un tubo eppendorf, después se centrifuga 3 min. a 2.3rpm y se retira el sobrenadante.
2. Se agregan 5 volúmenes de agua destilada estéril, se agita hasta que se resuspenda, se centrifuga a 2.3rpm por 3 min. y se retira sobrenadante.
3. Se adiciona $\frac{1}{2}$ volumen de NiSO_4 0.1M agitando por 5min, se centrifuga 2.3rpm por 3 min, y se retira el sobrenadante.
4. Se agregan 5 volúmenes de agua destilada y se agita 5 min, se centrifuga a 2.3rpm por 3 min. y se retira el sobrenadante.
5. Se repite el paso 8 y 9 dos veces más.
6. Por ultimo se resuspende la columna en 1 volumen de tampón de fosfatos con 0.05M de imidazol

Rompimiento de las células

1. Durante el proceso del rompimiento celular se mantiene todo en hielo. El botón de 50mL de células inducidas se resuspende en 300 μL de solución I (5 μL de cóctel de inhibidor de

proteasas SIGMA p-2717 de uso general y 995 μL de tampón de fosfatos 20mM de Na_2HPO_4 , 0.5M de NaCl y 0.05M Imidazol, pH 7.4*), la suspensión que se forma es sometida a sonicación de 3 pulsos 10 segundos por 1 min. de reposo con una amplitud de 60 Hz y se centrifugar 8000rpm en frío por 10 min.

2. El sobrenadante se recupera en un tubo eppendorf, y se mantiene en hielo, paralelamente se resuspende el botón en 200 μL de sol. I, el cual se somete nuevamente a sonicación de 3 pulsos 20"/1min. de reposo.

3. Se mezcla el sobrenadante que se recupero con el sonificado de 2 y se añade tritón al 20%, quedando a una concentración final del 1%.

4. El volumen se ajusta a 1mL con sol. I y se deja en agitación suave durante 1 h; posteriormente se centrifuga a 17000rpm en frío por 15 min.

5. Se filtra el sobrenadante en una membrana de 0.45 μ y el filtrado se coloca en la columna de sefarosa niquelada con agitación continua por 5 min. a temperatura ambiente.

6. Se sedimenta el gel por centrifugación a 2.3rpm 5min, el sobrenadante (proteínas no adsorbidas) se recupera y se guardan en un tubo eppendorf para analizarlo en un gel SDS-PAGE.

Lavados de la columna

1. Se adicionan 5 volúmenes de tampón de fosfatos con 0.05M de imidazol y se resuspende la columna agitando 5 min, después se centrifugar a 2.3rpm por 3min

2. Se recupera el sobrenadante y se guarda para análisis en un gel SDS-PAGE.

3. El paso de lavado se repite 9 veces más (guardando el sobrenadante en diferentes tubos para su posterior análisis)

Elución de la columna

1. Se adicionan 2 volúmenes de tampón de elución (20mM de Na_2HPO_4 , 0.5M de NaCl y 0.25M de Imidazol, pH 7.4*), se agita por 5 min y se centrifuga a 2.3rpm por 3min.

2. El sobrenadante (proteína purificada) se recupera en un tubo eppendorf.

Se repite cuatro veces los dos pasos anteriores (guardando cada elusión en un tubo diferente para su análisis).

*Se ajusta el pH con ácido fosfórico

III.D Ensayos de Adsorción al sustrato.

1. Se lavan 2 g de almidón de maíz insoluble tres veces con 10 mL de agua destilada estéril, (se agita durante 10 min y se centrifuga a 4000 rpm); por último el almidón es resuspendido en 10 mL de tampón de citrato-fosfatos pH 5.0 (Tp Cit-Ph).

2. Las muestras se preparan de la siguiente forma:

Muestras			
Tubo	Almidón (µL)	Tp Cit-Ph (µL)	Proteína. (µL)
1	30	0	30
2	30	4	26
3	30	8	22
4	30	12	18
5	30	16	14
6	30	20	10
7	30	22	8
8	30	24	6
9	30	26	4
10	30	28	2
11	30	29	1

Muestras Blancos (control)			
Tubo	Almidón (µL)	Tp Cit-Ph (µL)	Proteína. (µL)
1b	0	30	30
2b	0	34	26
3b	0	38	22
4b	0	42	18
5b	0	46	14
6b	0	50	10
7b	0	52	8
8b	0	54	6
9b	0	56	4
10b	0	58	2
32	0	59	1

3. Las muestras son incubadas 30 min a 4°C con ligera agitación (6 rpm), posteriormente las muestras se centrifugan a 16000 rpm por 5min a 4°C y se recupera el sobrenadante.

4. La cantidad de proteína adsorbida se obtiene al restar la absorbancia obtenida a 280nm del tubo con almidón y proteína a la obtenida en el tubo blanco (contiene solo proteína). La concentración de las proteínas se obtuvo mediante la aplicación de la ley de Lambert y Beer.