



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Especificidad de la adsorción de la α -amilasa de *Lactobacillus
amylovorus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

OLIVER RAMIREZ MEDEL

DIRECTOR DE TESIS:

Doctora Romina Rodríguez Sanoja

2010





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.

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos de alumno Ramírez Medel Oliver 56554248 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300208700</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor Dra. Romina Rodríguez Sanoja</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Sergio Sánchez Esquivel</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Ing. Química Ángela Victoria Forero Forero</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C Beatriz Ruíz Villafán</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Adán Chávez Castillo</p>
<p>7. Datos del Trabajo escrito. Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del Trabajo escrito Especificidad de la adsorción de la alfa-amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i> 62 p 2010</p>

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio, por la oportunidad que me brindó desde el primer día en el Instituto de Biomédicas. A la Dra. Romina por el camino de ardua enseñanza y la oportunidad de seguir aprendiendo en cada instante. A cada uno de mis compañeros de laboratorio por una nueva amistad, enseñanza, paciencia y ayuda en momentos difíciles, A Paola, Daniel, Ricardo, Javieron, Silvia Andrea, Katy y María, Yoselin, Monserrat, Carinita y Falina. A todos mis compañeros del laboratorio del Dr. Sergio por su amistad. A mis colegas, Chucho, Tania Gil, Mauricio, Alba, Yolis y Alfredivo. Laurita gracias por su gran apoyo en momentos cruciales en el laboratorio, gracias. A mis sinodales Bety, Adán y Fore por su enseñanza. A Paty por su enseñanza y gran apoyo en Cromatografía, gracias.

A mis padres Lidia y Vicente que desde siempre me han brindado su apoyo y comprensión, a mi madre que es mi adoración. A mi hermana Katy y a mi hermosa sobrina Lupita. A Emilio, que siempre nos ubica que no podemos bajar los brazos en cada instante.

A mis abuelitos Pachita, Lorenzo, Lola y Fernando Medel que siempre me decía, que ya a dentro lo importante era terminar. A mis tíos que desde donde se encuentren, tenían razón, gracias y hasta luego. A la Familia Castro, gracias padrino, a mis padrinos de bautizo, Lilia y Ángel. A la Familia Ramírez, a todos mis tíos y mis primos. A la Familia Medel, Clau y Fer.

A Naya por su apoyo, cariño y fuerza que me brindó. A mis amigos de la carrera de Biología que como ustedes eran contados, hasta el fin, Cristóbal, Mari, Carlos Ramírez, Vania, Juanitomoto, Claudia, Miguel Alba, Memo, Karla Elisa, Ale Vieira, Alberto rock, Helda, Norberto, Itxel, Itzel, Maritza, Billy, Nicolás, Tania, Poncho, Cata, Paty, Damián, Turcio, Gaby, Humberto, Jaime, Alfredo, Chino, Emmanuel, Omar, Roberto crazy, Oscar, Onazis, Javier, Juan Pablo, Selene, Ale, Daniela, Ana Lilia, Vero, a la banda en general y a todos y cada uno ustedes que de manera directa o indirecta, buena o no tan buena hicieron que llegara hasta esta meta cumplida. Agradecer a los maestros de la carrera por compartir su conocimiento: Dr. Antonio Lazcano, Dr. Luis Felipe Jiménez. Dra. Beatriz de hongos, Dr. Francisco de Biotecnología, Dr. Luis Arreola, A y a todos los que ejercieron presiones de selección.

Especificidad de la adsorción de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Contenido:

	Página
Resumen-----	5
Introducción-----	6
Antecedentes-----	8
1. Almidón-----	8
1.1. Composición química del almidón-----	8
1.2. Composición del gránulo de almidón-----	10
2. Enzimas amilolíticas-----	12
2.1. α -amilasas-----	13
2.2. Estructura de las α -amilasas-----	14
2.3. Módulos de unión a carbohidratos-----	15
2.4. Estructura y función de los Dominios de Fijación al almidón-----	16
2.5. Bacterias lácticas amilolíticas-----	18
Objetivo-----	21
Justificación-----	21
Materiales y métodos-----	22
Resultados-----	30
Discusión-----	42
Conclusión-----	44
Referencias-----	45
Apéndices-----	51

RESUMEN

En estudios previos se observó que la α -amilasa completa de *Lactobacillus amylovorus* es capaz de adsorberse al almidón insoluble mientras que la amilasa troncada era incapaz de adsorberse al almidón insoluble (Rodríguez *et al.* 2000). El presente trabajo se realizó con el fin de caracterizar la capacidad de adsorción de la α -amilasa sobre diferentes polisacáridos de glucosa incluyendo lineales, ramificados y cíclicos. Se incluyeron polímeros con enlaces alfa-1,4, alfa-1,6 y poco comunes como alfa-1,2, alfa-1,3. Utilizando electroforesis de afinidad se analizó su capacidad de unión y se calculó una constante de disociación (Kd) aparente. Se observó que la α -amilasa reconoce específicamente al almidón, y polisacáridos de glucosa como la amilosa, el glucógeno y el pululano.

INTRODUCCION

Las α -amilasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos alfa-1,4 presentes en el almidón y polímeros semejantes, generando productos de longitud variable en la configuración α -anomélica (Van der Marel *et al.* 2001). La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* está constituida por 954 aminoácidos, los cuales forman dos dominios funcionales: los primeros 474 aminoácidos al dominio catalítico y los aminoácidos 475 al 954 el dominio de unión ó fijación al almidón (DFA). Este DFA está constituido por cinco módulos en tándem de 91 aminoácidos cada uno, esta estructura no ha sido reportada en ninguna otra amilasa (Morlon *et al.* 2000). El DFA en las amilasas permite la interacción de la enzima en solución con el sustrato insoluble, esta interacción ayuda a facilitar la interacción entre el sustrato y el sitio del dominio catalítico y en ocasiones, desestabiliza las cadenas de almidón para facilitar su hidrólisis (Boraston *et al.* 2004).

Rodríguez-Sanoja *et al.* (2000) observó que los sustratos mejor hidrolizados por la α -amilasa de *L. amylovorus* son amilopectina, almidón soluble, glucógeno y alfa-ciclodextrina mientras que la actividad es menor sobre amilosa y la α -amilasa es incapaz de hidrolizar pululano, beta-ciclodextrina, gama-ciclodextrina. Por otro lado, estudiando la adsorción al almidón insoluble, se demostró que la α -amilasa sin el DFA es incapaz de adsorberse y por lo tanto no puede hidrolizar el almidón insoluble mientras que la α -amilasa completa (con el DFA) se adsorbe y por lo tanto hidroliza los gránulos de almidón. Posteriormente se demostró que de manera independiente los péptidos formados por 1MR, 2MR, 3MR y 4MR y el mismo DFA con cinco MR son capaces de adsorberse al almidón insoluble y que al actuar de manera conjunta se presenta un efecto sinérgico entre los módulos que optimiza la adsorción (Guillen *et al.* 2007).

Se ha reportado que los dominios de unión a carbohidratos pueden ser extremadamente específicos a un sustrato o unirse a más de un sustrato (almidón, xilosa, quitina, celulosa, manano). Por ejemplo, el CBM29 de *Piromyces equi* se une a celulosa y manano (Charnok *et al.* 2002). En el caso del CBM44 de *Clostridium thermocellum* se une a sustratos que presenten azúcares de glucosa solo en la configuración beta-1,4 (Najmudin *et al.* 2005). Aunque deben existir bases moleculares que determinen la especificidad, éstas no están claramente establecidas y menos aún se han estudiado sistemas con módulos en tándem.

Así, este trabajo pretende contribuir caracterizando la especificidad con la que la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* se adsorbe a sustratos insolubles que no pueden estudiarse por metodologías tradicionales como la calorimetría de titulación donde se requieren sustratos solubles.

ANTECEDENTES

1. Almidón:

El almidón es un polisacárido de reserva sintetizado en el citoplasma de las células de plantas y en forma de gránulos insolubles (Van der Marel *et al.* 2001). Se encuentra en órganos de las plantas como semillas, frutas, tubérculos y raíces (Jobling *et al.* 2004).

1.1 Composición química del almidón.

Los gránulos de almidón están compuestos por dos polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina.

Las moléculas de glucosa en la amilosa están unidas por enlaces glucosídicos alfa-1,4 forman cadenas lineales largas no ramificadas; estas cadenas tienen un grado de polimerización (GP: número de unidades de glucosa) de 200 a 6000 unidades y con un peso molecular aproximado de 1×10^5 a 1×10^6 Da (Figura 1) (Smith *et al.* 1997; Tester *et al.* 2004). Las moléculas de amilosa adoptan una conformación helicoidal donde cada vuelta de la cadena está integrada por seis unidades de glucosa formando un interior hidrofóbico (Lehninger, 1993; Voet, 2004). Las cadenas de amilosa tienen una alta capacidad de unirse a soluciones iodadas, al intercalarse el yodo a ellas se adquiere una coloración azul (Ball *et al.* 1996).

En almidones nativos, la amilosa ocupa una proporción del 20-35%. La proporción de amilosa y amilopectina varía acorde al origen del almidón (Smith *et al.* 1997).

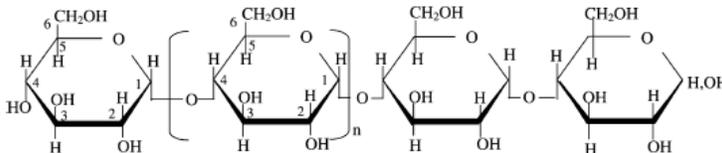


Figura 1. Estructura química de la amilosa, formada por unidades de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4.

Las cadenas de amilopectina son cortas y están unidas por enlaces alfa-1,4 con puntos de ramificación alfa-1,6, en promedio cada 24 a 30 residuos de glucosa (Voet, 2004) (Figura 2). El GP es de 10 a 60 unidades pero el GP total puede ser de miles y con un peso molecular que va de 1×10^7 a 1×10^9 Da (Tester *et al.* 2004). La amilopectina tiene una baja capacidad de unirse al yodo por lo que se tiñe de café-rojo en una solución yodada (Denyer *et al.* 2001). La proporción de ramificación en la amilopectina es del 4 a 5% pero varía con respecto al origen.

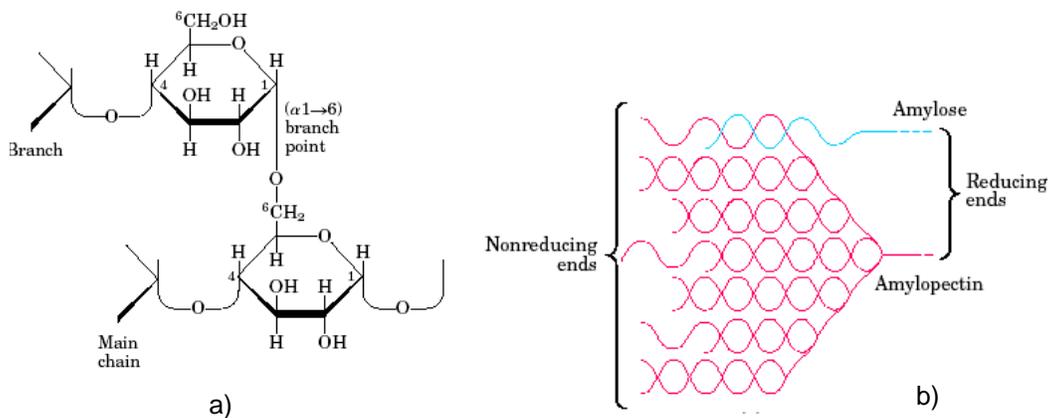


Figura 2. Estructura de la amilopectina: a) Presenta cadenas con enlaces alfa-1,4 y ramificaciones con enlaces alfa-1,6. b) Las cadenas de amilopectina están dispuestas desde un extremo reductor a uno no reductor.

Las cadenas de amilopectina pueden ser clasificadas en términos del tamaño y su consecuente posición en los gránulos de almidón. Las cadenas de amilopectina tipo A, están unidas por enlaces alfa-1,6 las cadenas B, que por su tamaño de cadena son conocidas como B1, B2, B3 y B4. Las cadenas A y B1 son más externas y forman dobles hélices (cristalinas), su tamaño es característico de su origen genético (Smith *et al.* 1997). Las cadenas tipo A contienen de 12 a 16 unidades y B1 de 20 a 24 unidades (Sajilata *et al.* 2006) (Figura 3).

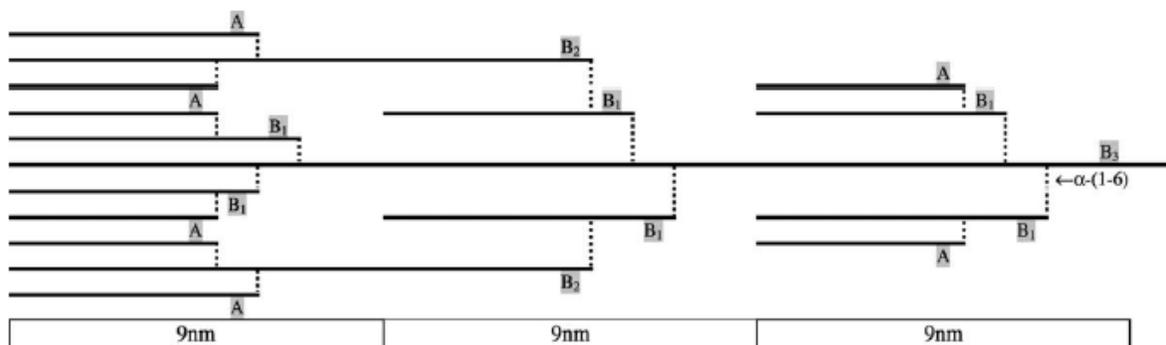


Figura 3. Representación esquemática de una sección de cadenas de amilopectina A, B₁, B₂ y B₃ con puntos de ramificación en alfa-1,6, donde se observa que las cadenas A se pueden unir por enlaces alfa-1,6 a cadenas B₂ y estas a su vez a cadenas B₃.

1.2. Composición del Gránulo de almidón.

Cerca del 70% de la masa del gránulo de almidón permanece como amorfa y cerca del 30% como cristalina. La región amorfa contiene una alta cantidad de amilosa y poca amilopectina, mientras que la región cristalina consta fundamentalmente de amilopectina (Swift *et al.* 1991).

Hay regiones llamadas lamelas cristalinas reconocidas por una asociación compacta de dobles hélices que contienen cadenas primarias A y espacios de cadenas B. Las lamelas cristalinas están alternadas con regiones amorfas que contienen enlaces que ramifican en alfa-1,6 con cierta periodicidad. La longitud conservada de unidades repetidas de la lamela amorfa y cristalina es de 9 a 10 nm (Denyer *et al.* 2001).

Las lamelas cristalinas son divididas en unidades discretas llamadas clústers en donde cadenas adyacentes de amilopectina se alinean en dobles hélices y forman arreglos cristalinos con el gránulo. Sin embargo, no todo el gránulo es cristalino, ya que se encuentran capas concéntricas alternadas de amilopectina amorfa y semicristalina como anillos creciendo en el gránulo (Ball *et al.* 1996) (Figura 4). Las moléculas de amilopectina se encuentran arregladas radialmente en el gránulo con los extremos no reductores de las cadenas hacia la superficie.

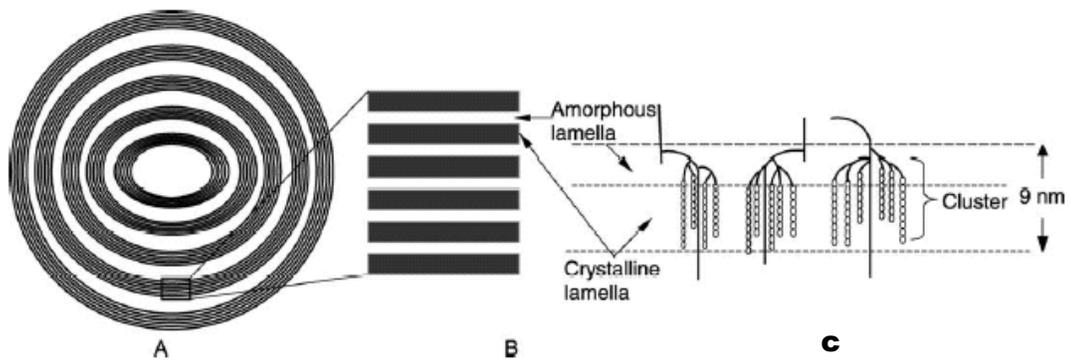


Figura 4. Esquema de la estructura lamelar del gránulo de almidón: A) Apilamiento de la lamela cristalina, separada por anillos de crecimiento amorfos. B) Visión magnificada de las regiones amorfas y cristalinas. C) Formación de dobles hélices por cadenas adyacentes de amilopectina para formar lamelas cristalinas. En los puntos de ramificación se forman las lamelas amorfas.

Estudios basados en patrones de difracción de rayos X mostraron la estructura y orientación de las cadenas de amilosa en diferentes almidones. Esto permitió clasificarlos en polimorfismos tipo A (cereales), B (papa y plátano) y C (guisantes y frijol) en particular por el tamaño de la cadena (TC) de amilopectina, la densidad de empaquetamiento de las cadenas con el gránulo y la presencia de agua (figura 5).

La estructura de tipo A contiene amilopectina con TC de 23 a 29 unidades de glucosa que forman micelas de seis dobles hélices que se empaquetan de manera hexagonal, rodeando un canal central ocupado por otra doble hélice. La estructura B forma dobles hélices de amilopectina con tamaños de 40 a 44 unidades y un canal central ocupado por agua. En el tipo C las cadenas de amilopectina van de 26 a 29 unidades y se considera que es una combinación tipo A y B (Sajilata *et al.* 2006).

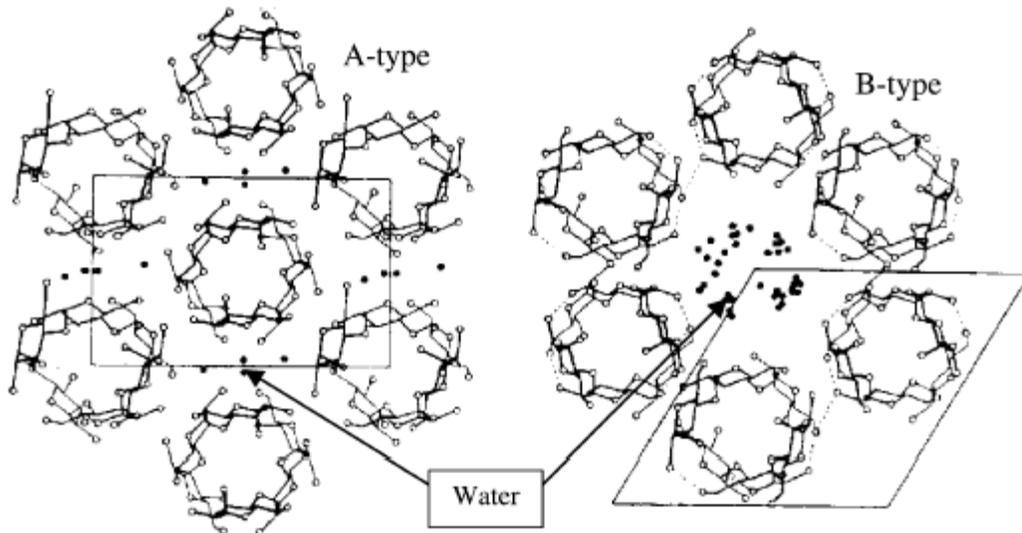


Figura 5. Polimorfismos de almidón cristalino tipo A y B

2. Enzimas amilolíticas:

Las amilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos del almidón para generar diversos productos, incluyendo dextrinas y progresivamente polímeros pequeños de unidades de glucosa. Estas enzimas constituyen aproximadamente el 25% del mercado enzimático en la industria (Reddy *et al.* 2003). Hay gran variedad de aplicaciones de amilasas en la industria: en detergentes se usan como quitamanchas; en la licuefacción y sacarificación de almidón, para la panificación dando cuerpo y volumen a la masa, en la elaboración de bebidas como jugos y cerveza con bajas calorías, en la reducción de grumos de almidón en los textiles, en la producción de papel al reducir el exceso de almidón, etc.

Las amilasas están ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida, en las plantas, animales, hongos, microorganismos; sin embargo las amilasas de hongos y bacterias dominan las aplicaciones del sector industrial (Reddy *et al.* 2003).

El término “amilasas” engloba cuatro tipos de enzimas:

- Endoamilasas: (α -amilasas) que hidrolizan enlaces alfa-1,4 al interior de las cadenas de almidón produciendo oligosacáridos de varios tamaños y dextrinas límite (oligosacáridos ramificados).
- Exoamilasas: (β -amilasas) que actúan sobre el extremo no reductor del penúltimo enlace de las cadenas de almidón liberando unidades de maltosa y dextrina.
- Enzimas desramificadoras: (Glucoamilasas, pululanasa, isoamilasas y amilopululanasa), enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6 de polisacáridos ramificados como amilopectina, glucógeno y pululano, sus productos de hidrólisis son glucosa, maltosa y pequeñas cantidades de oligosacáridos.
- Transferasas: (Ciclodextrin-glucosiltransferasas-CGTasas) son un grupo de enzimas capaces de formar y romper enlaces alfa-1,4 glucosídicos. Catalizan la ciclización de fragmentos de amilosa, formando ciclooligosacáridos (Arellano y Olmos, 1999; Van der Marel et al. 2001).

Una 2ª clasificación se ha hecho en base a la estructura primaria de glucósido hidrolasas (GH). En esta clasificación las α -amilasas de *Lactobacillus* se engloban en la familia GH13 (Davies y Henrissat, 1995), la cual presenta un plegamiento característico en barril (β/α)₈ (MacGregor, 2005). Además presentan un mecanismo catalítico en donde tres residuos de aminoácidos (un ácido glutámico (Glu) y dos ácidos aspárticos (Asp) del sitio activo, se unen al sustrato y los productos que generan retienen la configuración α -anomérica (MacGregor *et al.* 2001).

2.1. α -amilasas:

Las α -amilasas (EC 3.2.1.2) son endoamilasas que actúan hidrolizando los enlaces glucosídicos alfa-1,4; los productos que generan son mono u oligosacáridos de longitud variable en la configuración α -anomérica y dextrinas límite. El dominio catalítico posee una estructura de barril (β/α)₈ (figura 6). Y presentan cuatro regiones conservadas en su secuencia primaria que contiene los aminoácidos que forman el sitio activo y algunos aminoácidos que estabilizan la topología del barril (β/α)₈ (Nielsen y Borchert, 2000): la región I se encuentra en el C-terminal de la tercer lámina β y es una región importante para la interacción con los residuos de glucosa del sustrato; la región II se localiza en la cuarta lámina β y es donde se encuentra el residuo de aspartato que funciona como nucleófilo durante la catálisis; la región III esta en el C-terminal de la quinta lámina β y

contiene al residuo de ácido glutámico que actúa como ácido/base; y la región IV se encuentra en el asa (loop) que conecta la séptima lámina- β con la séptima α -hélice y en el cual está presente un ácido aspártico necesario para la actividad catalítica. También está presente un residuo de histidina tanto en la región I como IV y se cree que forman junto con el último ácido aspártico puentes de hidrógeno con residuos de la glucosa del sustrato (Janecek, 1997).

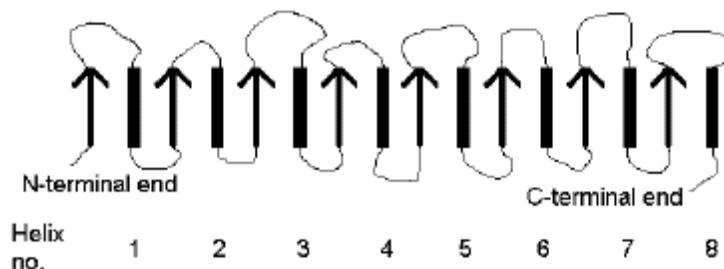


Figura 6. Esquema de la disposición del barril $(\beta/\alpha)_8$ de la familia 13 de las α -amilasas. Las flechas negras representan las láminas- β , los rectángulos a las α -hélices y las líneas más delgadas representan los loops.

2.2. Estructura de las α -amilasas.

El dominio A es el más conservado y conocido de la familia 13 de las α -amilasas (barril $(\beta/\alpha)_8$), el dominio B emerge entre la tercer lámina β -plegada y la tercer α -hélice del barril y forma, junto con el dominio A, la bolsa del sitio activo. El dominio C sigue al barril catalítico β/α . Este está formado por láminas β que forman una estructura β -sándwich y se sabe ayuda a estabilizar el dominio A al proteger los aminoácidos hidrofóbicos del solvente (Nielsen y Borchert, 2000; Van der Marel *et al.* 2001). A este dominio C en algunas α -amilasas pueden seguir algunos dominios adicionales, como el dominio E, el dominio E se sabe que se adsorbe al almidón insoluble (Janecek *et al.* 2003) y por tanto se clasifica como módulo de unión a carbohidrato (CBM) y específicamente se le denomina dominio de fijación al almidón (DFA) (CAZY, http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html). La estructura de este dominio está formada por láminas β que forman un barril β distorsionado.

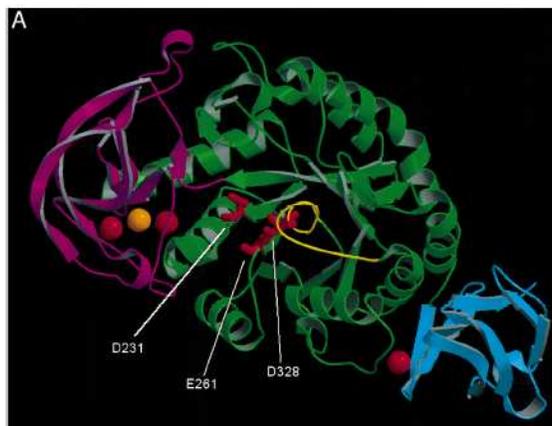


Figura 7. Estructura esquemática de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*: el dominio A es mostrado en verde. El dominio B es mostrado en color violeta y el dominio C es mostrado en azul.

2.3 Módulos de unión a carbohidratos (CBM).

Un módulo de unión a carbohidrato es definido como una secuencia de ~ 30 a 200 aminoácidos contigua a una proteína o enzima activa sobre carbohidratos (Shoseyov *et al.* 2006). Los CBM tienen características y funciones independientes del dominio catalítico. Entre estas se encuentran: Efecto de proximidad, mantiene la enzima en proximidad con el sustrato. Ayuda al dominio catalítico a llevar al sustrato a su sitio activo. Algunos módulos de unión al almidón tienen un efecto de disrupción sobre la estructura del polisacárido, lo que aparentemente aumenta la capacidad de degradación (Boraston *et al.* 2004).

En un principio los módulos de unión a carbohidratos eran clasificados como dominios de unión a celulosa (CBD por sus siglas en inglés) ya que sólo se había descubierto los que se unían a celulosa. Sin embargo se ha visto que existen módulos o dominios que se unen a muy diversos carbohidratos como xilano, quitina, almidón, manano, etc., por lo que se decidió clasificarlos en familias como módulos de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés) (Rodríguez *et al.* 2005). Al igual que a las glucósido hidrolasas, estos módulos son clasificados por la similitud en su secuencia de aminoácidos (CAZY, <http://www.cazy.org/Home.html>). Existen 53 familias de las cuales 8, CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM41, CBM45, CBM48 y CBM53, se unen a almidón y se les denomina Dominios de fijación a Almidón (DFA).

Aproximadamente 10% de las enzimas amilolíticas en las glucosidohidrolasas: GH13, GH14, GH15 poseen un módulo de unión al almidón. El DFA de la familia GH13 (α -amilasas), GH14 (β -amilasas) y GH15 (Glucoamilasas) se analizó con el objetivo de esclarecer las relaciones evolutivas entre los DFA y las amilasas. El árbol evolutivo obtenido mostró dos ramas evolutivas de bacterias (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium* y *Pseudomonas*) y la de hongos (mohos y levaduras). Aparentemente el DFA evolucionó como un módulo independiente de los dominios catalíticos, ya que su filogenia refleja la mejor la evolución de las especies y no la de las amilasas individuales (Janecek *et al.* 1999).

2.4. Estructura del DFA:

El plegamiento dominante del DFA es el β -sandwich, este plegamiento comprende dos láminas β , en donde cada una presenta de tres a seis hebras β -antiparalelas (Rodríguez *et al.* 2005).

La estructura del DFA de la familia CBM20 de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* esta compuesto aproximadamente por 100 aminoácidos que constituyen dos láminas β (Nathalie *et al.* 2002). La primera lámina consiste de cinco hebras organizadas de manera antiparalela y la segunda lámina organiza una hebra paralela y un par de hebras antiparalelas. El N y C-terminal se encuentran en los extremos expuestos de la molécula. Este arreglo forma una estructura de ocho hebras β que se organizan en un barril abierto distorsionado, con un enlace disulfuro entre el N-terminal y el asa (loop) formado por la 7ª y 8ª hebra (Sorimachi *et al.* 1996).

2.5. Función del DFA.

El DFA de la familia CBM20 ha sido la más estudiada. La función de los módulos de unión a carbohidratos se ha descrito en diferentes enzimas en esta familia, como la CGTasa de *Bacillus circulans* 125; la α -amilasa-maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*, β -amilasa de *Bacillus cereus* variedad *micoides*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, etc. (Machovick y Janeek, 2006).

En el caso del DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, se demostró que se unía a la beta-ciclodextrina (un análogo del almidón), mostrando que existen dos sitios de unión independientes

en el DFA que son estructural y funcionalmente diferentes. El primer sitio de unión es pequeño, accesible y está involucrado en el reconocimiento inicial del almidón, contiene dos triptófanos (Trp⁵⁴³ y Trp⁵⁹⁰) que apilan sobre ellos a dos unidades de glucosa para la unión, ya que forman un sitio compacto y rígido al exponer una superficie hidrofóbica apropiada para la interacción inicial con el almidón. El segundo sitio de unión es más extenso y flexible, ayuda a llevar el sustrato al sitio catalítico generando un rearrreglo conformacional. La interacción específica en este sitio de unión es atribuido a la Tyr⁵²⁷ y Tyr⁵⁵⁶. Es importante en este ejemplo la función de dos sitios de unión para la interacción con beta-ciclodextrina (Giardana *et al.* 2001; Nathalie *et al.* 2002).

Sin embargo, el mecanismo descrito no es general, parece ser que cada familia agrupa particularidades en cuanto al mecanismo de unión. En el caso de la familia CBM26 solamente ha sido descrita la estructura del DFA de la α -amilasa formadora de maltohexosa de *Bacillus halodurans* (Boraston *et al.* 2006). En esta enzima se encontró un sólo sitio de unión, en el cual los aminoácidos involucrados en la unión a este sustrato son Trp³⁶, Tyr²³ y Tyr²⁵. Los aminoácidos Trp³⁶ y Tyr²⁵ forman interacciones hidrofóbicas con el sustrato, mientras que Gln⁷¹, Gly⁷⁶ y Glu⁷⁷ forman puentes de hidrógeno que ayudan a estabilizar el complejo. En resumen las interacciones principales entre CBM26-maltosa son hechas por uniones hidrofóbicas que involucran principalmente aminoácidos aromáticos y puentes de hidrógeno, características en aminoácidos polares.

3. Bacterias Lácticas amilolíticas.

Existe una amplia diversidad de géneros y especies de bacterias ácido lácticas (BAL). Aunque el término bacteria láctica no es taxonómico, si agrupa bacterias con características semejantes. Estas presentan un contenido de G+C menor del 50%, son bacterias Gram-positivas que pueden crecer bajo condiciones microaerófilas y algunas ser anaerobias estrictas, no forman esporas, y producen en gran medida ácido láctico durante el proceso de fermentación de azúcares (Holtzapfel *et al.* 2001).

Las BAL pueden ser encontradas en el suelo, agua, estiércol, aguas residuales, ensilados y en alimentos fermentados. Uno de los ejemplos más importantes de estos microorganismos es su papel como simbiosis del cuerpo humano (cavidad oral, tracto intestinal y urogenital) en el cual actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Actualmente se les puede encontrar como productos comerciales de alimentos ó suplementos y preparaciones farmacéuticas como probióticos (Klein *et al.* 1998).

Bacterias lácticas amilolíticas se han aislado de diferentes fermentaciones ricas de almidón, por ejemplo: *Lactobacillus plantarum* se aisló de fermentaciones de casava en Nigeria y Congo. *Lactobacillus fermentum* de mawé y ogi (fermentaciones de maíz) de Benin, Africa (Giraud *et al.* 1994; Sanni *et al.* 2001) [34]. *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylophilus* de desperdicios de fermentaciones de maíz en USA (Zhang y Cheryan, 1991; Castillo *et al.* 1993) y *Lactobacillus manihotivorans* fue aislado de la fermentación de almidón de mandioca colombiana (Morlon *et al.* 1998).

Los genes de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans* fueron secuenciados y se encontró que comparten una identidad del 98% (Rodríguez *et al.* 2005). La primera mitad del gen en el extremo 5' codifica para el dominio catalítico con las características comunes a todas las α -amilasas y hacia el extremo 3' en la segunda mitad de la secuencia codifica para el DFA, cual es una secuencia inusual que contiene cinco secuencias repetidas e idénticas de 273 pb cada una en el caso *L. amylovorus* y cuatro secuencias repetidas para el DFA de *L. plantarum* con 312 pb cada una (Giraud y Cuny, 1997). Para *L. manihotivorans* son cuatro secuencias repetidas con 320 pb en cada secuencia (Morlon *et al.* 2000). Así, las tres enzimas están organizadas en dos dominios funcionales: un dominio catalítico que va del aminoácido 1 al 474 y un DFA a partir de los aminoácidos 475 al 953 (Santiago *et al.* 2005).

El DFA en el extremo C-terminal en cada una de las α -amilasas está formado por aproximadamente 500 aminoácidos en tándem, que forman módulos repetidos (MR) de 91 aminoácidos cada uno para *L. amylovorus*, 104 aminoácidos para *L. plantarum* (Giraud y Cuny, 1997) y 98 aminoácidos para *L. manihotivorus* (Morlon et al. 2000). Los MR se han clasificado dentro de la familia CBM26 de los CBM (CAZY, http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html)

El DFA de *L. plantarum* y *L. manihotivorus* se encuentra flanqueado entre el dominio catalítico y sus MR por regiones ricas en serinas y treoninas. Se ha dicho que estas regiones intermedias pueden incrementar la movilidad de los MR (Giraud y Cuny, 1997; Morlon et al. 2000). En contraste el DFA de *L. amylovorus* no conserva estas regiones intermedias (Santiago et al. 2005).

Para verificar las funciones de actividad y adsorción de la α -amilasa de *L. amylovorus* sobre almidón insoluble, se construyeron dos plásmidos, uno con la α -amilasa completa y un segundo con la α -amilasa sin el DFA (es decir, solo el dominio catalítico). Se expresaron en una cepa silvestre no amilolítica de *L. plantarum*; encontrándose que en el caso de la α -amilasa completa, se conserva la capacidad de hidrolizar almidón insoluble. Por su parte la α -amilasa sin el DFA no es capaz de adsorberse ni de hidrolizar el almidón insoluble, dejando claro que la capacidad de hidrólisis de la α -amilasa es determinada inicialmente por la adsorción del DFA sobre el almidón insoluble. También se estableció la actividad enzimática sobre diferentes polisacáridos de los cuales los mejor hidrolizados son amilopectina, almidón soluble, glucógeno y alfa-ciclodextrina, en el caso de la amilosa se encontró menor actividad hidrolítica, y en el caso de pululano, beta-ciclodextrina, gama-ciclodextrina la α -amilasa es incapaz de hidrolizarlos (con la α -amilasa entera) (Rodríguez et al. 2000).

En el laboratorio, experimentos de adsorción de la α -amilasa, el DFA y los módulos con 1MR, 2MR, 3MR y 4MR sobre gránulos de almidón insoluble, demostraron que un módulo aislado puede adsorberse y que el DFA completo puede adsorberse más que cuatro y este a su vez más que uno, dos y tres MR sugiriendo que cada módulo repetido puede adsorberse al gránulo y actuar como un módulo de fijación independiente y que en conjunto pueden actuar de manera aditiva ó sinérgica optimizando la adsorción (Figura 8) (Guillén et al. 2007).

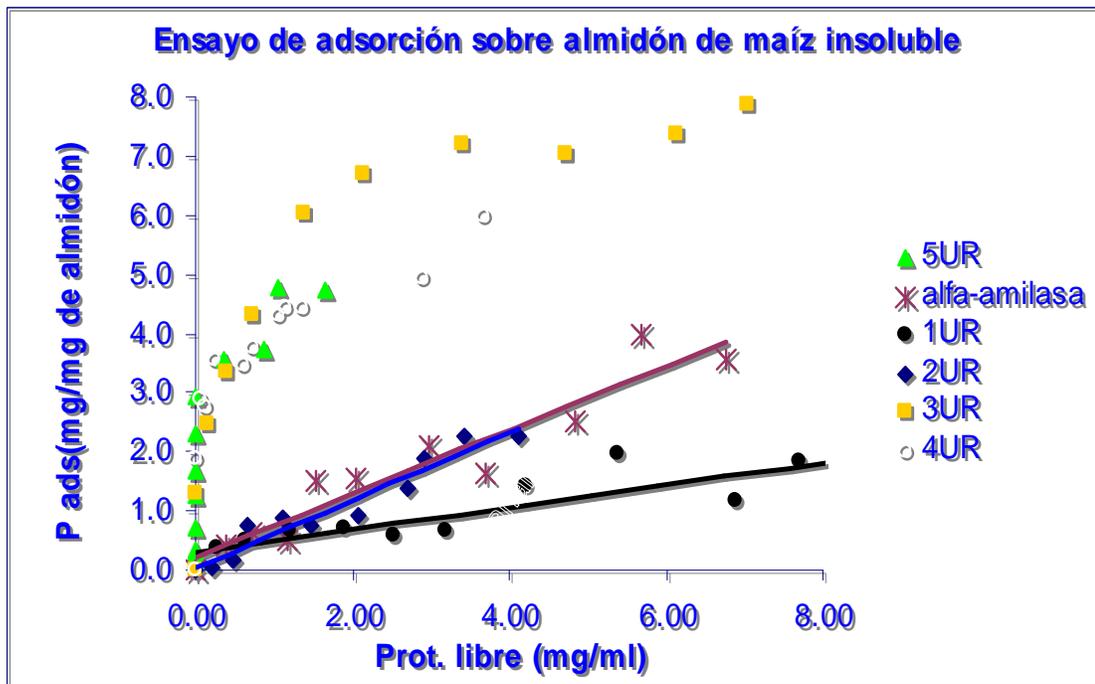


Figura 8. Ensayo de adsorción de: 1MR, 2MR, 3MR, 4MR y la α -amilasa completa sobre almidón insoluble.

Justificación:

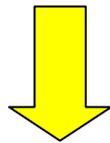
Se ha reportado que en función de su estructura, los dominios de fijación a carbohidratos pueden ser extremadamente específicos a un sustrato o unirse a más de un sustrato (almidón, xilano, quitina, celulosa, manano, etc.) sin que se haya podido establecer las bases moleculares de la especificidad del DFA y menos aún en el caso de módulos en tándem, por lo que se estableció como objetivo de este trabajo.

Objetivo:

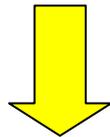
Estudiar la especificidad de adsorción del dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* sobre polisacáridos lineales y ramificados.

DISEÑO METODOLÓGICO:

Activar la cepa de *Lactobacillus amylovorus* que produce la α -amilasa en medio MRS con almidón.



Purificación de la α -amilasa por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa con beta-ciclodextrina como ligando.



Realizar los ensayos de retención en geles de afinidad con diferentes polisacáridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Características y conservación del microorganismo.

Microorganismo	Características
<i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4540 (Agriculture Research Service culture collection, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois.)	Cepa productora de α -amilasa, aislada de desperdicios de maíz fermentado de USA (Nakamura 1981).

L. amylovorus se conservo en glicerol al 40% a -70 °C.

1.- Producción de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

- Activación de *L. amylovorus*.

L. amylovorus se preinoculó al 5% en un volumen de 10 ml de medio MRS con almidón al 2% (ver apéndice) y se incubó a una temperatura de 29°C durante 24 horas. Se inoculó al 1% en un volumen de 10 ml de medio MRS con almidón al 2% a 29°C durante 18 horas. Se midió el crecimiento de *L. amylovorus* espectrofotométricamente a una densidad óptica de 600 nm a las 12, 16 y 20 horas.

- Determinación de presencia de actividad amilolítica de la α -amilasa por el método de yodo-yoduro.

Se midió actividad amilolítica de la α -amilasa de *L. amylovorus* por el método de yodo-yoduro, en complejo con el almidón. El método de yodo-yoduro (KI/I_2) en complejo con el almidón actúa intercalándose entre las hélices de la amilosa generando una coloración azul.

Se hizo una curva patrón con almidón PROLABO. Se le agregó a cada tubo 2.4 ml de la solución de yodo-yoduro (ver apéndice). Se agitó en el vortex y se leyó en el espectrofotómetro densidad óptica (DO) a 620 nm.

- Cuantificación de la actividad de la α -amilasa.

A las 12, 16 y 20 horas de crecimiento de *L. amylovorus* se midió actividad amilolítica. Se tomó 1 ml de muestra del cultivo en un microtubo y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante que es donde se encontraba la amilasa producida por *L. amylovorus*.

Se tomaron 6 tubos, tres se marcaron como control y tres se marcaron como muestra: en el control se puso 80 μ l de solución de almidón PROLABO, 10 μ l de enzima antes de la purificación (previamente recuperada del sobrenadante) y 10 μ l de ácido sulfúrico 2N para detener la hidrólisis enzima-sustrato, finalmente se puso en hielo. En la muestra, se puso 80 μ l de solución de almidón, 10 μ l de enzima (previamente recuperada del sobrenadante) y se puso a incubar a 63°C por 10 minutos, al pasar el tiempo se le agregaron 10 μ l de solución de ácido sulfúrico 2N y finalmente se puso en hielo. En cada tubo de control y muestra se le agregaron 2.4 ml de la solución yodo-yoduro al 4%. Los tubos se agitaron en el vórtex y se leyeron en el espectrofotómetro a 620 nm. Los datos obtenidos se aplicaron a la relación (1) de actividad amilolítica a los controles y a las muestras de la amilasa.

$$U/ml = \frac{(DO \text{ control} - DO \text{ muestra}) * 1 * 3}{p} \quad (1)$$

Donde:

U: es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en un tiempo dado.

1/p: es el inverso de la pendiente (p ó m) en la ecuación ($y=mx+b$).

DO control: densidad óptica del control con la amilasa y almidón sin hidrolizar

DO muestra: densidad óptica de la muestra con la amilasa y almidón hidrolizando.

3: Es el tiempo teórico que duró 3 minutos la hidrólisis del complejo amilasa-almidón.

Todos los datos de los controles y muestras utilizadas en este ensayo se hicieron por triplicado, así mismo los datos se aplicaron en una hoja de cálculo obteniendo los valores de promedio, desviación estándar, etc. La pendiente, el coeficiente de correlación de la curva patrón se sustituyeron en la relación (1) de actividad amilolítica.

Una vez obtenido el tiempo óptimo de activación y de actividad amilolítica, se inoculó *L. amylovorus* al 1% en un volumen de 1000 ml de medio MRS más almidón a 29°C durante 16 horas. Se recuperó el volumen y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.45 µm (Millipore). Al filtrado se le agregó inhibidor de proteasa (cocktel Sigma 1X, 1:500).

2.- Purificación de la α -amilasa de *L. amylovorus* en un sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) utilizando una columna de afinidad de sefarosa acoplada con beta-ciclodextrina.

El sistema de FPLC es utilizado en un amplio rango de purificaciones por cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, afinidad, entre otros. La cromatografía de afinidad separa proteínas con interacciones reversibles (hidrofóbicas, con puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals,) sobre un soporte (matriz). La fase estacionaria es una resina sólida que forma una matriz. Se utilizan columnas que contengan un espacio donde se empaqueta la matriz conteniendo pequeñas partículas que forman la cama de resina. El FPLC es un término utilizado para todos los sistemas de cromatografía que utilizan un solvente líquido como fase móvil. La velocidad de la fase móvil del solvente es controlada por bombas. Las bombas controlan la tasa de flujo del solvente. En la cromatografía de afinidad: El ligando es unido covalentemente a la matriz sólida. Solamente la proteína que tenga afinidad por el ligando previamente acoplado a la matriz se va unir. Al final se lava la matriz en la columna para dejar sólo los componentes deseados como proteínas, péptidos, fragmentos de DNA, etc. Se hace la elución cambiando concentraciones de pH ó sal o con una molécula que compita por la unión con el ligando.

- Purificación de la amilasa

El sobrenadante recuperado se pasó por una columna de sefarosa acoplada a beta-ciclodextrina (ver apéndice). Se pasó todo el sobrenadante a un flujo de 1ml/min. Se lavó la muestra que se unió a la resina con el amortiguador de la fase móvil, citrato-fosfato pH5, 0.1 M, hasta que no hubo

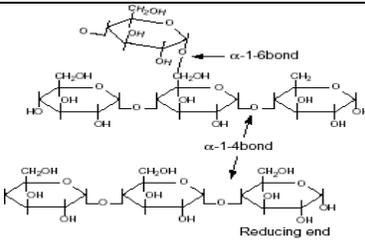
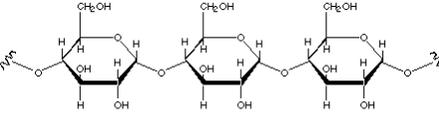
lectura de proteína (λ 280 nm, UV). Después de lavar la resina, la proteína adsorbida a la columna se eluyó con 70 ml de amortiguador citrato-fosfato pH5 0.1 M con beta-ciclodextrina (9 mg/ml).

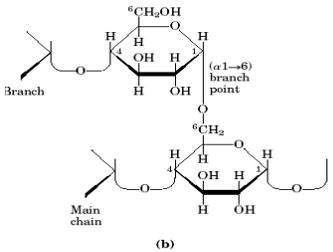
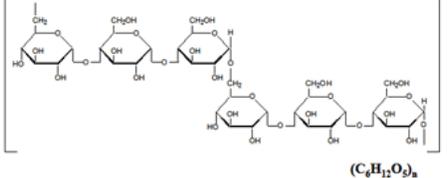
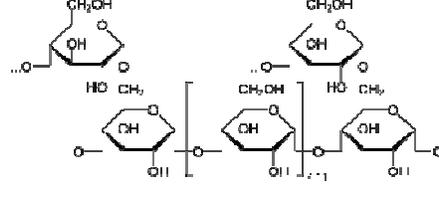
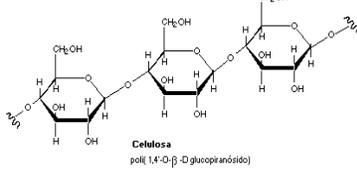
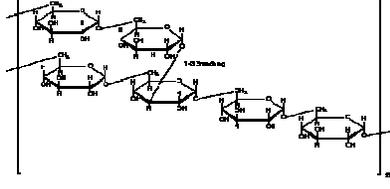
La amilasa se recuperó en fracciones de 1 ml. Se verificó en geles SDS-PAGE al 7.5% la pureza de la proteína. Se determinó la cantidad de amilasa pura presente en cada una de las fracciones por el método de Bradford (ver apéndice). Se midió actividad amilolítica a cada una de las fracciones por el método de yodo-yoduro.

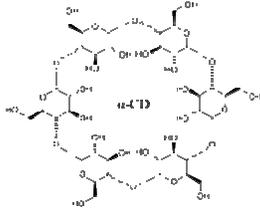
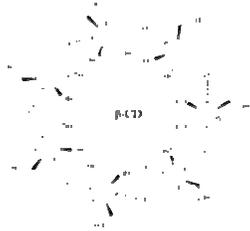
3.- Ensayos de retención empleando electroforesis en geles de retardo.

Una vez purificada la α -amilasa se procedió a realizar los ensayos de retención de la enzima, en geles de retardo con almidón y polisacáridos con diferente grado de ramificación (Tabla 1). Los geles de retardo contienen todos los reactivos de un gel nativo de poli(acrilamida) (N-PAGE) más el polisacárido, el cual es embebido mientras éste polimeriza. Con este método es posible analizar las interacciones entre sustancias puras como la α -amilasa con diferentes polisacáridos (Horejsi, 1984).

Tabla 1. Polisacáridos utilizados en los ensayos de retardo.

Polisacárido	Característica estructural	Esquema	Proveedor
Almidón	Cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 con ramificaciones también de glucosa en alfa-1,6.		SIGMA
Amilosa	Cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces α -1,4.		SIGMA

Amilopectina	Cadenas de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 y cadenas laterales que se ramifican en alfa-1,6 cada 24 a 30 unidades de glucosa.	 <p>(b)</p>	SIGMA
Pululano	Cadenas de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 y cadenas que ramifican en alfa-1,6 cada 3 unidades de glucosa.	 <p>$(C_6H_{12}O_6)_n$</p>	SIGMA
Glucógeno de mejillón	Cadenas de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 y ramificaciones en alfa-1,6 cada 8 a 12 unidades de glucosa.		(IIM - CSIC, España)
Celulosa	Cadenas de glucosa unidas por enlaces beta-1,4.	 <p>Celulosa pol(1,4-O-β-D-glucopiranosido)</p>	SIGMA
Dextrano	Cadenas de glucosa con enlaces mayores alfa-1,6 y ramificaciones con enlaces en alfa-1,2, alfa-1,3 y alfa-1,4.		FLUKA

alfa-ciclodextrina	Ciclo-oligosacárido con 6 unidades de glucosa.		SIGMA
beta-ciclodextrina	Ciclo-oligosacáridos con 7 unidades de glucosa.		SIGMA
gama-ciclodextrina	Ciclo-oligosacáridos con 8 unidades de glucosa.		SIGMA

Una vez establecido los polisacáridos que retuvieron la amilasa, se realizó electroforesis en geles de retardo (ver apéndice) con concentraciones crecientes de 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml (Takeo, 1984). La cantidad de la amilasa se midió por absorbancia a 280 nm y se aplicó la relación (2) de Lambert-Beer para obtener la concentración de la enzima en miligramos. El coeficiente ϵ de extinción molar teórico de la amilasa

$$C = \frac{D.O * dilución * PM}{\epsilon} \quad (2)$$

Donde:

ϵ = coeficiente de extinción molar teórico de la amilasa es de $\epsilon = 207680 \text{ L}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}$ (Rodríguez, 2005).

C= concentración (mg/ml).

D.O = densidad óptica 280 nm.

P.M. = peso molecular de la amilasa es de 105 KDa.

Dilución = dilución de la enzima

El análisis de los datos de migración de la α -amilasa en los geles de retardo se realizaron con la relación **(3)** (Takeo, 1984); que relaciona la migración de la proteína (amilasa) en el gel y la concentración del polisacárido, esto con el fin de obtener una constante de disociación "Kd" de la amilasa con cada uno de los polisacáridos en uso.

$$\frac{1}{r} = [L] * \frac{1}{Kd * R0} * \frac{1}{R0} \quad (3)$$

Donde:

$1/r$ = es la distancia de migración de la amilasa en el gel de electroforesis con polisacárido.

$1/R0$ = es la distancia de migración de la amilasa en el gel de electroforesis sin polisacárido.

[L] = Concentración del polisacárido.

Kd = Constante de disociación.

Takeo, 1984, consideró el parámetro de constante de disociación, a partir del desarrollo matemático en el equilibrio químico de la disociación de: proteína libre ([P]libre) + ligando libre ([L]libre) que son formados por el complejo proteína-ligando ([PL]). Con este método es posible observar la retención de la amilasa con cada uno de los polisacáridos específicos en geles de retardo y paralelamente, obtener cuantitativamente valores de disociación para cada ensayo. La distancia de migración de la amilasa se midió en cm, con la ayuda de un vernier a partir de límite inferior del pozo del gel, hasta donde migra la amilasa en los geles de retardo.

Las consideraciones para obtener las constantes de disociación (K) se referían a que la concentración total de cada uno de los polisacáridos (almidón, amilosa, glucógeno y pululano) en el gel debe ser mucho mayor que la concentración total de la proteína (amilasa). En consecuencia una 2ª consideración es que todas las moléculas de la proteína se combinan con el polisacárido, esta interacción del complejo se refleja en un decremento de la movilidad que es de cero.

RESULTADOS

- Producción y Purificación de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

Para establecer el momento adecuado de recuperación de la enzima y sabiendo que la producción de la amilasa está ligada al crecimiento, se midió la DO_{600} y la actividad amilolítica a las 12, 16 y 20 horas. El máximo crecimiento, al igual que la mayor producción de amilasa se observó a las 16 horas (Figura 9). Por lo que este tiempo de cultivo se decidió recuperar los sobrenadantes para purificar la amilasa.

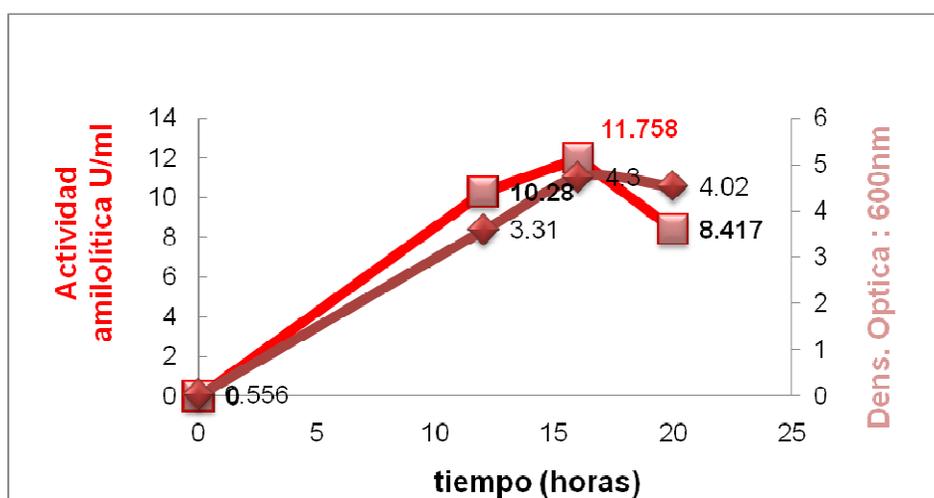


Figura 9. Crecimiento (◆) y actividad de la α -amilasa (■) de *L. amylovorus* en medio MRS-almidón. El tiempo óptimo de crecimiento y actividad fue a las 16 horas.

La α -amilasa se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa-beta-ciclodextrina. Se cuantificó, la actividad amilolítica de cada una de las fracciones obtenidas de la purificación por el método de yodo-yoduro y la concentración de proteína total por el método de Bradford. En la figura 10 se puede observar el pico de actividad amilolítica que se superpone a la concentración de proteína aproximada en las fracciones 7-9.

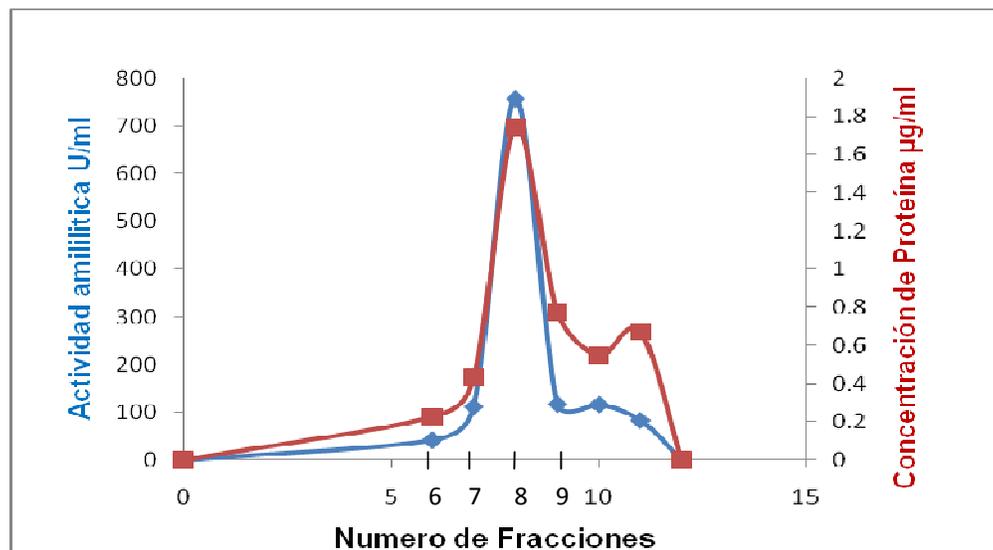


Figura 10. Actividad amilolítica (♦) y concentración de proteína total (■) de las fracciones obtenidas en la purificación de la α -amilasa de *L.amylovorus*.

La pureza de las fracciones se verificó en geles SDS-PAGE 7.5%, en la figura 11 se puede observar la enzima pura a partir en los carriles 7, 8, 9 y 10. Así mismo la actividad específica de la enzima aumento 47 veces más y se recupero el 82.1% de la enzima en un solo paso de purificación (Tabla 2).

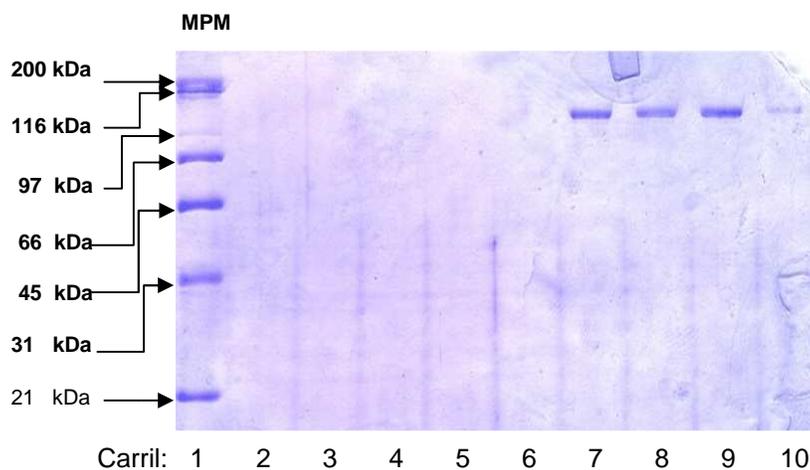


Figura 11. Gel SDS-PAGE al 7.5% que muestran la purificación de la amilasa. Carril 1: marcador de peso molecular (MPM) de amplio rango (Bio Rad). Carriles 2 a 6: últimos lavados de la columna. Carriles 7 a 10: elución de la amilasa pura.

Tabla 2. Purificación de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

Etapas:	Volumen Inicial. ml	Actividad Inicial U/ml	Actividad Total U	[Proteína] μg/ml	Proteína. Total μg	Actividad Específica U/mg	Recuperación %	Purificación
Cultivo (sobrenadante)	1000	11.099	11099	1.77	1770	6.3	100	1 vez
Columna de Afinidad	7	1301	9107.6	4.91	34.4	296.6	82.1	47 veces más pura.

Una vez purificada la amilasa fue posible realizar los ensayos de retención de la amilasa con almidón y diferentes polisacáridos de glucosa.

- Ensayos de retención de la α -amilasa de *L. amylovorus* en geles de retardo con polisacáridos lineales y ramificados:

La amilasa pura se dializó en amortiguador citrato-fosfato pH 5.5, 0.1 M para eliminar el exceso de beta-ciclodextrina presente en las fracciones de la elución. Las muestras se concentraron, sublimando el amortiguador en un SpeedVac (SPD1010, System), y la cantidad de proteína aproximada se estableció aplicando la relación (2).

Los ensayos de retención se realizaron en geles de retardo con concentraciones crecientes (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) de cada uno de los polisacáridos específicos, de acuerdo a la metodología propuesta por Takeo, 1984, que relaciona el inverso de la distancia de migración de la proteína en el gel con la concentración del ligando ([L]). Los polisacáridos en los que se adsorbió la α -amilasa fueron el almidón, la amilosa, el pululano y el glucógeno (ver figura 12, 13, 14 y 15),

respectivamente. La concentración denominada "0", corresponde a geles nativos al 7.5% de poliacrilamida sin polisacárido, se utilizó como control de cada ensayo la amilasa. Como control negativo de retención, se utilizó una proteína de referencia, en este caso la albúmina sérica bovina (BSA, 3 $\mu\text{g/ml}$) sin sustrato en el gel nativo, la cual migra similar en el gel de retardo con BSA y 10 mg/ml de sustrato, para cada uno de los polisacáridos (ver figura 12, 13, 14, 15).

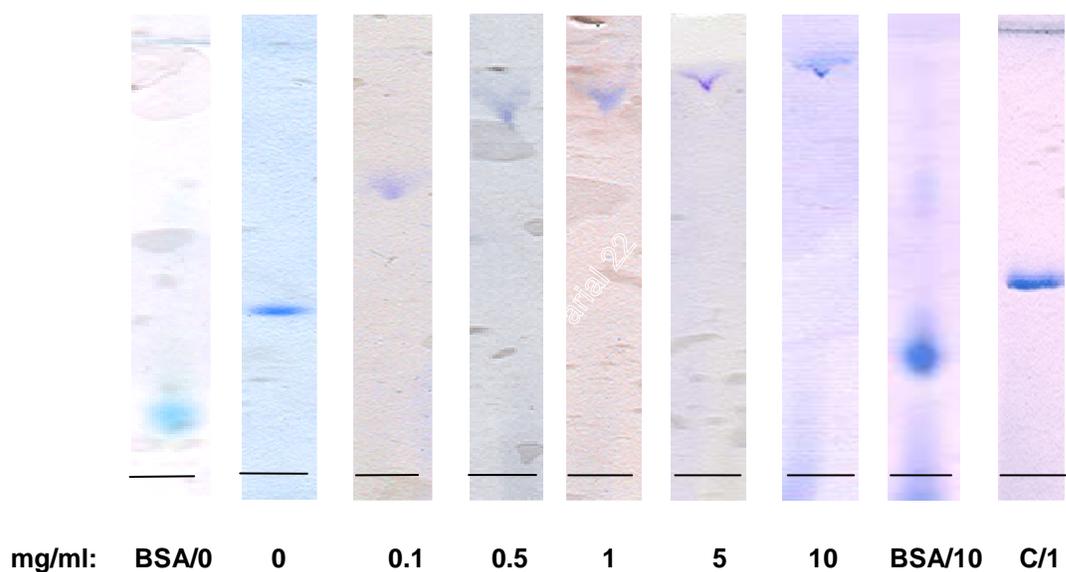


Figura 12. Geles de retardo donde se observa el efecto de concentraciones crecientes de almidón (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) en la migración de la amilasa. 0: amilasa sin almidón. La proteína de referencia BSA/0 migra de manera similar con concentración "0", sin almidón y de retardo con BSA/10 mg/ml de almidón. El gel denominado C/1 corresponde a la migración de la amilasa con 1 mg/ml de celulosa. La línea continua representa el frente de cada gel.

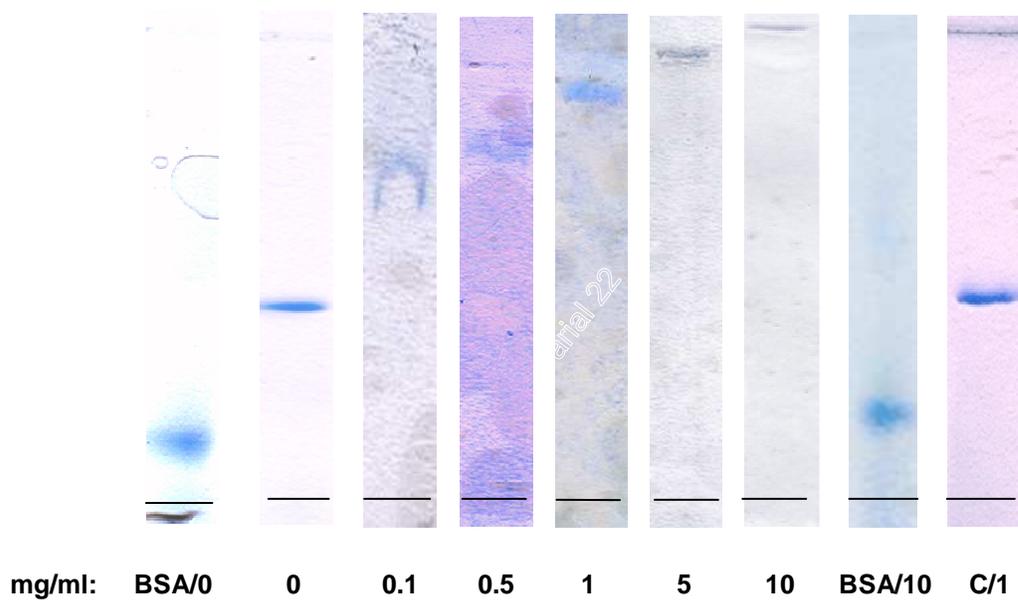


Figura 13. Geles de retardo donde se observa el efecto de concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) crecientes de amilosa en la migración de la amilasa. 0: amilasa sin amilosa. La proteína de referencia BSA/0 migra similar con concentración 0, sin amilosa y de retardo con BSA/10 mg/ml de amilosa. El gel denominado C/1 corresponde a la migración de la amilasa con 1 mg/ml de celulosa. La línea continua representa el frente de cada gel.

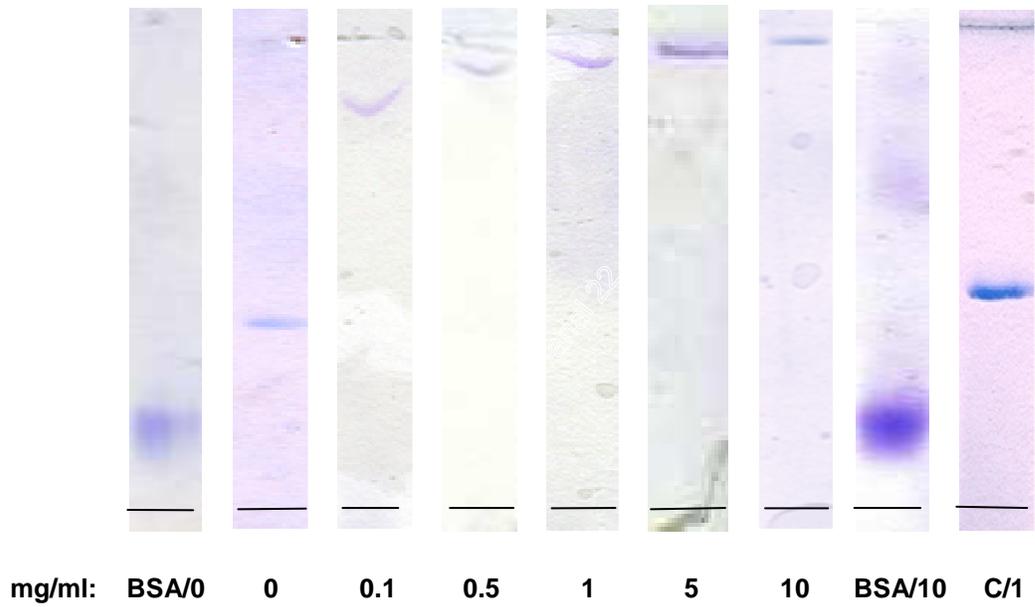
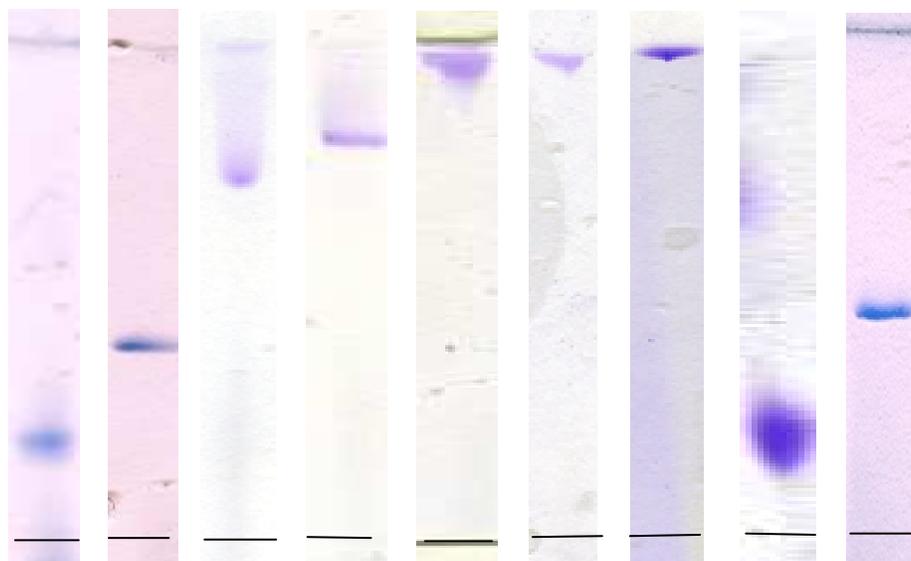


Figura 14. Geles de retardo donde se observa el efecto de concentraciones crecientes de pululano (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) en la migración de la amilasa. 0: amilasa sin pululano. La proteína de referencia BSA/0 migra de manera similar en el gel con concentración 0 sin pululano y de retardo con BSA/10 mg/ml de pululano. El gel denominado C/1 corresponde a la migración de la amilasa con 1 mg/ml de celulosa. La línea continua representa el frente de cada gel.



mg/ml: BSA/0 0 0.1 0.5 1 5 10 BSA/10 C/1

Figura 15. Geles de retardo donde se observa el efecto de concentraciones crecientes de glucógeno (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) en la migración de la amilasa. 0: amilasa sin glucógeno. La proteína de referencia BSA/0 migra similar en el gel con concentración 0, sin glucógeno y de retardo con BSA/10 mg/ml de glucógeno. El gel denominado C/1 corresponde a la migración de la amilasa con 1 mg/ml de celulosa. La línea continua representa el frente de cada gel.

Se observa claramente que conforme aumenta la concentración de cada uno de los polisacáridos hay una mayor retención de la amilasa. También se puede observar que la amilasa es menos retenida en los geles con almidón (Figura 12) y amilosa (Figura 13) que en los geles con glucógeno (Figura 14) y pululano (Figura 15). En gel de retardo con celulosa (1mg/ml) no hubo retención de la amilasa, mostrado en la figura 12, 13, 14 y 15, ya que la distancia de migración de la amilasa fue similar que cuando migraba en los geles con la concentración denominada "0", sin polisacárido. No hubo retención de la amilasa en geles con dextrano, alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina y gama-ciclodextrina. A las concentraciones probadas la migración con estos polisacáridos fue similar a la presentada en los geles con celulosa.

La figura 16 muestra la retención de la proteína al ligando, graficando la distancia de migración de la amilasa representada por "r" en relación a la concentración [L] del polisacárido (mg/ml) en uso. Nuevamente, se observa que a medida que aumenta la concentración de cada uno de los polisacáridos aumenta la retención de la amilasa.

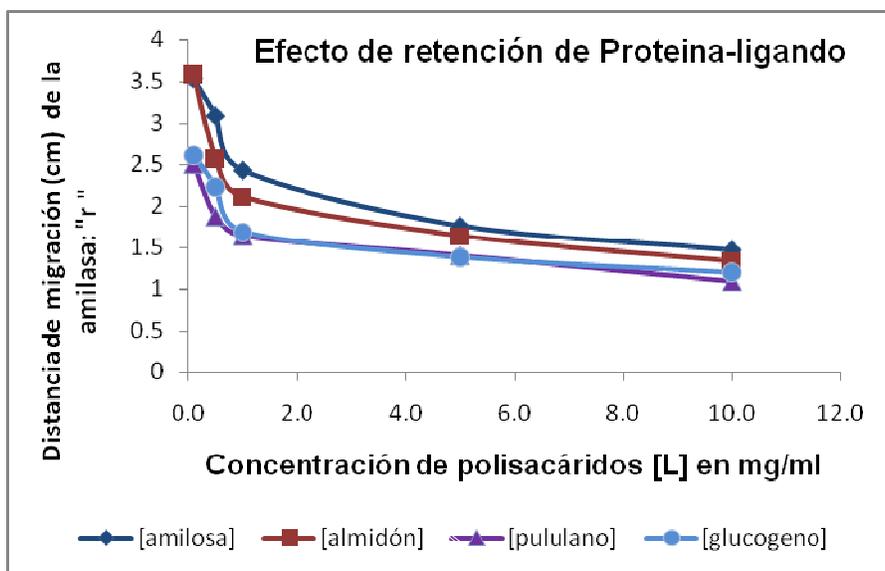
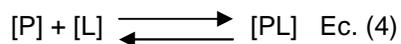


Figura 16. Distancia de migración (cm) de la amilasa en el gel y la concentración del polisacárido [L], en concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml de Almidón (■), Almilosa (◆), Glucógeno (●) y Pululano (▲).

Análisis de los datos de retención

Los datos obtenidos en geles de retardo pueden ser analizados cuantitativamente utilizando el razonamiento propuesto por Takeo (1984) que considera las concentraciones de la proteína libre [P] más el ligando libre [L] y del complejo [PL] en la ecuación (4) y (5).



A partir del equilibrio $[P] + [L] \rightleftharpoons [PL]$ se obtiene la constante de disociación "Kd".

$$K_d = \frac{[P] + [L]}{[PL]} \quad \text{Ec. (5)}$$

Usando un gel N-PAGE, a una concentración de polisacárido específico se le denomina "[L]". Cuando se carga una muestra de la proteína en el gel y se procede a la electroforesis, las moléculas de la proteína se combinan con una parte del polisacárido en el gel. Resultando en la disminución de la movilidad de la banda de la proteína.

La extensión ó disminución en la movilidad de la proteína es dependiente de la concentración del polisacárido "[L]".

[L] es la concentración del polisacárido libre en el gel y es un valor variable, el cual depende de la concentración de la proteína. Por lo tanto, es una condición, donde la concentración total del polisacárido en el gel "[L]" es mucho mayor que la concentración total de la proteína ($[L] \gg [P]_t$).

Cuando todas las moléculas de proteína se combinan con el polisacárido, la movilidad de la banda de proteína será de cero.

Se consideró la distancia de migración de la proteína en ausencia del polisacárido en el gel, expresada como "R0". Y la distancia de migración en el gel de la proteína "r" en presencia del polisacárido a una concentración de "[L]".

Con las variables "R0", "r" y "[L]" es posible calcular la constante disociación de las proteínas "R0" y "r" con su respectivo ligando "[L]" de geles nativos y de retardo.

Se modela la disociación por la ecuación (6).

$$\frac{R_0}{r} = \frac{[P]_t}{[P] \text{ libre}} \quad \text{Ec. (6)}$$

En donde:

R0: Es la distancia de migración de la división entre la "Amilasa y el BSA" en el gel de electroforesis sin polisacárido (cm)

r: es la distancia de migración de la proteína (amilasa) en el gel de electroforesis con polisacárido (cm)

Donde [P]_t es la concentración de la proteína (Amilasa) total. Entonces, sustituyendo [P]_t = [P] libre + [PL] en la ecuación (6); esta puede ser transformada en la ecuación (7)

$$\frac{R0}{r} = \frac{[P] \text{ libre} + [PL]}{[P] \text{ libre}}$$

$$\frac{R0}{r} = \frac{1 + [PL]}{[P] \text{ libre}} \quad \text{Ec. (7)}$$

Si se sabe que la Kdisociación = 1/ Kdisociación = [PL]/ [P] [L].

$$\text{Entonces: } \frac{R0}{r} = 1 + \frac{[PL]}{[P] \text{ libre}} * \frac{[L]}{[L]}$$

$$\frac{R0}{r} = 1 + \frac{[PL]}{[P] [L]} * \frac{[L]}{1}$$

$$\frac{R0}{r} = 1 + \frac{1}{Kdisociación} * \frac{[L]}{1}$$

Por lo tanto la ecuación "lineal" es $\frac{R0}{r} = 1 + \frac{[L]}{Kdisociación}$ Ec. (8)

Para graficar la ecuación y quede en forma de recta **y=mx+b** se despeja "R0" de:

$$\frac{R0}{r} = 1 + \frac{[L]}{Kdisociación}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{(1 + [L] * \frac{1}{Kd})}{R0}$$

$$\text{Quedando } \frac{1}{r} = (1 + \frac{[L]}{Kd}) \frac{1}{R0}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{R0} * \frac{[L]}{Kd * R0}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{[L]}{Kd * R0} + \frac{1}{R0}$$

La relación **(9)** final de Takeo, 1984, es:

$$\frac{1}{r} = [L] * \frac{1}{Kd * R0} * \frac{1}{R0} \quad (9)$$

De la relación (9) se obtiene por regresión lineal la ordenada al origen y la pendiente. A partir de estas se determina la constante de disociación (10).

$$m = \frac{1}{Kd * R0} \Rightarrow Kd = \frac{1}{m * R0} \quad (10)$$

Para aplicar esta ecuación lineal a los datos obtenidos, se graficó el inverso de la migración contra la concentración de los polisacáridos probados, obteniéndose la gráfica siguiente:

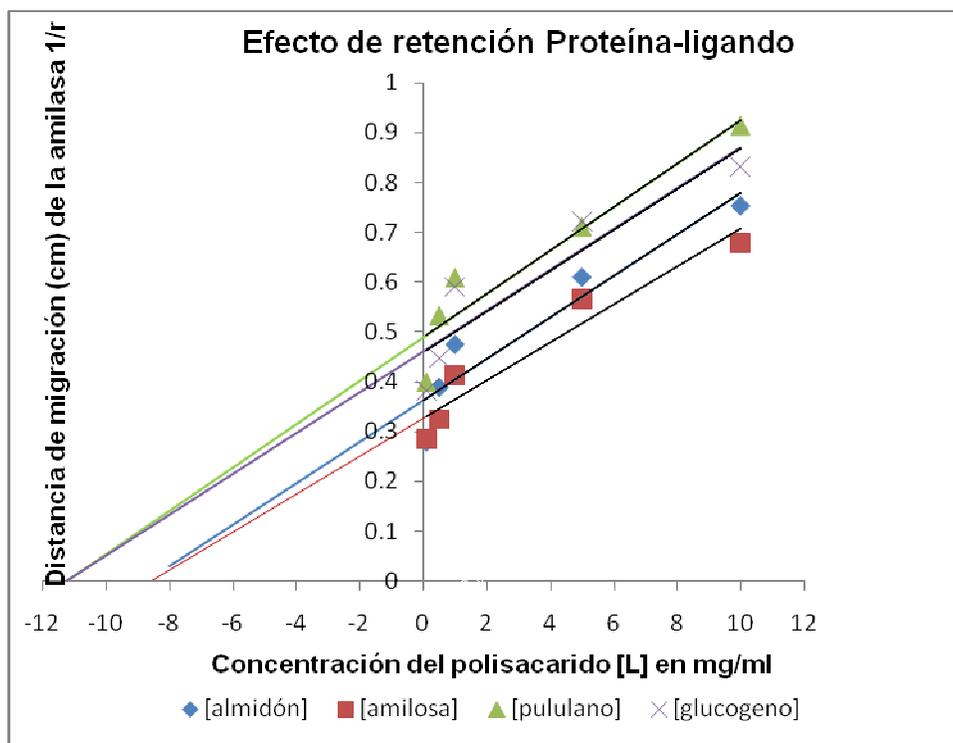


Figura 17. Linearización de los datos de migración (cm) obtenidos en relación a la concentración del polisacárido (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml y 10 mg/ml) de Almidón (■), Amilosa (◆), Glucógeno (×) y Pululano (▲).

Se calculó a partir del gráfico la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) para poder obtener las constantes de disociación (K) para el almidón ($K_d = 66.66$ mg/ml), amilosa ($K_d = 83.33$ mg/ml), glucógeno ($K_d = 52.63$ mg/ml) y pululano ($K_d = 47.61$ mg/ml) (Tabla 3). Estos valores nos permiten analizar cuantitativamente la interacción del complejo Proteína-ligando.

Tabla 3. Constantes de disociación (K_d) para los polisacáridos específicos.

Polisacárido	Relación (3), pendiente (m), ordenada al origen (b) y su coeficiente de correlación (r^2).	$K_d =$ constante de disociación mg/ml
Almidón	$y = 0.0417x + 0.3622$; $r^2 = 0.8923$	66.66
Amilosa	$y = 0.0381x + 0.3266$; $r^2 = 0.9269$	83.33
Glucógeno	$y = 0.0410x + 0.4595$; $r^2 = 0.8539$	52.63
Pululano	$y = 0.0435x + 0.4892$; $r^2 = 0.8982$	47.61

DISCUSION

En este estudio, establecimos la capacidad de la α -amilasa de *L. amylovorus* para unirse a diferentes polisacáridos. La α -amilasa se unió a cuatro de los diferentes polisacáridos probados en los ensayos de retardo a partir de una concentración de 1mg/ml. De entre ellos, la α -amilasa se unió específicamente a almidón, amilosa, glucógeno y pululano, todos ellos polisacáridos muy semejantes, pero cada uno con diferente grado de ramificación. Los demás azúcares probados no retuvieron a la amilasa, al menos en las concentraciones probadas; ya que la distancia de migración en los respectivos geles de retardo, resultó ser parecido a la que la α -amilasa experimenta cuando no tiene ligando, con concentración "0" (Takeo, 1984).

La α -amilasa presenta una apreciable unión con el almidón, amilosa y glucógeno, reflejado en sus constantes de disociación con almidón $K_d = 66.66$ mg/ml, amilosa, $K_d = 83.33$ mg/ml glucógeno $K_d = 52.63$ mg/ml y pululano con una $K_d = 47.61$ mg/ml.

Sabiendo que el almidón es una mezcla de cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 y por cadenas cortas de glucosa con ramificaciones en α -1,6, sorprende que haya retenido menos a la α -amilasa, que los demás polisacáridos (glucógeno y pululano). La amilosa que forma cadenas lineales de unidades glucosa unidas por enlaces α -1,4 presenta una constante muy próxima al almidón, lo que plantea que posiblemente el almidón que utilizamos estaba parcialmente hidrolizado y que por eso es soluble (Boraston *et al.* 2006).

Aparentemente una mayor densidad de ramificaciones retiene mejor a la α -amilasa. Ya que cuando existen ramificaciones alfa-1,6 en las cadenas cada 8 a 12 unidades de glucosa como en el glucógeno la α -amilasa es más retenida que en la amilosa. Lo mismo sucede en el caso del pululano que ramifica en alfa-1,6 cada tres unidades de glucosa, al parecer su alta densidad de ramificaciones facilitan la retención más aún que con glucógeno. Estos ensayos son consistentes con los ensayos de geles retardo del CBM26 de *Bacillus halodurans* que también mostraron retención para la amilosa y el pululano (Boraston *et al.* 2006).

En la figura 14, en los geles de retardo, con concentraciones de glucógeno 0.1, 0.5 y 1 mg/ml se observa un arrastre del complejo proteína-ligando. Se sabe que los polisacáridos están intercalados entre el tamiz de poliacrilamida y no polimerizaron junto con el gel de poliacrilamida, por lo que el complejo tanto de las moléculas de la amilasa con las del polisacárido pudieron estar

difundiéndose durante el proceso de electroforesis de los geles de retardo. Quizá si los polisacáridos estuvieran co-polimerizando con la poliacrilamida no se arrastrarían (Horejsi, 1986).

Los geles de retardo, donde no se observó arrastre en la migración de la amilasa en complejo con el almidón, amilosa, pululano y en las concentraciones con glucógeno 0.5 y 1 mg/ml, es posible que las cadenas de poliacrilamida pudieran estar generando uniones débiles como puentes de hidrógeno entre las cadenas de poliacrilamida y las de los polisacáridos, lo que permitiera no difundir el complejo proteína-ligando durante los ensayos de electroforesis. (Kendhale, 2006). Un efecto similar pudiera presentarse en el leve retardo que se observa en gel, cuando migra el BSA con 10 mg/ml de polisacárido (figuras 12 y 13) y en comparación a la migración del BSA sin polisacárido, este leve retraso de migración del BSA con polisacárido ha sido reportado en previos experimentos (Takeo, 1984; Flint *et al.* 2005).

CONCLUSIONES

La α -amilasa fue capaz de unirse a polisacáridos lineales y ramificados siempre y cuando la estructura del polisacárido contenga solo enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6.

Cuando existen grados de ramificación como el glucógeno, a más como el pululano, la retención de la α -amilasa es mayor que aquellos con bajo número de ramificaciones como el almidón y la amilosa.

Las constantes de disociación K_d de amilosa (80 mg/ml) y almidón (66.66 mg/ml) son mayores a las K_d presentadas por glucógeno (52.63 mg/ml) y pululano (47.61 mg/ml).

REFERENCIAS

- Arellano, F. y Olmos, J. 1999. *Enzimas amilolíticas microbianas*. Biotecnología 115 4-No 3.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonnas, P. and Preiss, J. 1996. *From Glycogen to Amylopectin: A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule*. Cell 86: 349-352.
- Boraston, A., Bolam, D., Gilbert, H. and Davies, G. 2004. *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. Biochemical Journal 382: 769-781.
- Boraston, A., Healey, M., Klassen, J., Ficko, E., Lammerts, A. and Law, V. 2006. *A Structural and Functional Analysis of α -Glucan Recognition by Family 25 and 26 Carbohydrate-binding Modules Reveals Conserved Mode of Starch Recognition*. Journal of Biological Chemistry 281: 587-598.
- Castillo, Carlos., Suárez, M., Gasparian, S. and Morlon, J. 1993. *Comparison of amylolytic properties of Lactobacillus amylovorus and Lactobacillus amylophilus*. Applied Microbiology and Biotechnology 40: 266-269.
- Charnok, S., Bolam, D., Nurizzo, D., Lorand, L., Mckie, V., Gilbert, H. and Davies, G. 2002. *Promiscuity in ligand-binding: The three-dimensional structure of a Piromyces carbohydrate-binding module CBM29-2 in complex with cello-and mannohexose*. Biochemistry 99: 14077-14082.
- Davies, G. and Henrissat B. 1995. *Structure and mechanisms of Glycosyl hydrolases*. Structure 3: 853-85.
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S. and Smith, A. 2001. *The control of amylase synthesis*. J. Plant Physiology 158: 479-487.
- Flint, J., Bolam, D., Nurizzo, D., Taylor, E., Williamson, M., Walters, C., Davies, G. and Gilbert, H. 2005. *Probing the Mechanism of Ligand Recognition in Family 29 Carbohydrate-binding Modules*. The Journal of Biological Chemistry. 280: 23718-23726.

Giardana T., Gunning P. A., Juge N., Craig, B. F., Furniss, S. M. C., Svenson B., Morris J. V. and Williamson G. 2001. *Both Binding Sites of the Starch-binding Domain of Aspergillus niger Glucoamylase are Essential for Inducing a Conformational Change in Amylose*. Journal Molecular Biology 313: 1149-1159.

Giraud, E., Champailler, A. and Raimbault, M. 1994. *Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology 60: 4319-4323.

Giraud, E. and Cuny, G. 1997. *Molecular characterization of the α -amilasa 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.

Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Pérez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sánchez S. and Rodríguez, R. 2007. *Alpha Amylase Starch Binding Domains: Cooperative Effects of Binding to Starch Granules of Multiple Tandemly Arranged Domains*. Applied and Environmental Microbiology. 73: 3833–3837.

Holzapfel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. 2001. *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. The American Journal of Clinical Nutrition 73: 365-373.

Horejsi, V. 1986. *Qualitative and Quantitative Applications of Affinity Electrophoresis for the Study of Protein-Ligand interactions: A Review*. Journal of Chromatography 376: 49-67.

Janecek, S. 1997. *α -amilase Family: Molecular biology and evolution*. Progress Biophysics Molecular Biology 67: 67-97.

Janecek, S. and Jozef, S. 1999. *The evolution of starch-binding domain*. FEBS Letters 456: 119-125.

Janecek, S., Svensson, B. and MacGregor, E. 2003. *Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal*. European Journal of Biochemistry. 270: 635-645.

Jobling, S. 2004. *Improving starch for food and industrial applications*. Current Opinion in Plant Biology 7: 210-218.

Flint, J., Bolam, D., Nurizzo, Didier., Taylor, E., Williamson, M., Walters, C., Davies, G. and Gilbert, H. 2005. *Probing the Mechanism of Ligand Recognition in Family 29 Carbohydrate binding modules*. The Journal of Biological Chemistry 280: 23718-23726.

Kendhale, A. 2006. *Isotactic N-alkyl acrylamide oligomers assume self-assembled sheet structure: first unequivocal evidence from crystal structures*. Chemistry. Communications 2006: 2756–2758.

Kirk, O., Vedel, T. and Crone, C. 2002. *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology 13: 345-351.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reunter, G. 1998. *Taxonomy and Physiology of probiotic lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology 41: 103-125.

Koivula, A. 2000. *Structure-function studies of two polysaccharide-degrading enzymes: Bacillus stearothermophilus α -amilase and Trichoderma reesei cellobiohydrolase II*. Technical Research centre of Finland, Espoo 1996 VTT Publications 277: 1-97.

Lehninger, A. 1993. *Bioquímica*, segunda edición, Ediciones Omega, S.A.

MacGregor, A., Janecek, S. 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.

MacGregor, A. 2005. *An overview of clan GH-H and distantly related families*. Biología, Bratislavia, 60/Supply. 16: 5-12.

Machovick M. and Janecek S. 2006. *Starch binding domains in the post genome era*. Cell. Molecular. Life Science. 63: 2710–2724.

Morlon, J., Guyot J.P., Pot, B., Jacobe, I. and Raimbault, M. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. Nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. International Journal of Systemic Bacteriology 48: 1101-1109.

Morlon, J., Mucciolo, F., Rodríguez, R. and Guyot, J.P. 2000. *Characterization of the L. Manihotivorans α -Amylase Gene*. DNA Sequence. 00: 1-11.

Myers, A., Morell, M., James, M., and Ball, S. 2000. *Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectina Crystal 1*. Plant Physiology 122: 989-997.

Najmudin, S., Guerreiro, C., Carvalho, A., Prates, J., Correia, P., Alves V., Ferreira, Luis., Romao, M., Gilbert, H., David, B. and Fontes, C. 2005. *Xyloglucan Is Recognized by Carbohydrate-binding Modules That Interact with β -Glucan Chains*. The Journal of Biological Chemistry 281: 8815-8828.

Nathalie, J., Le Gal Coeffet, M., Furniss, C., Gunning, A., Kramhoft, B., Morris, V., Williamson G. and Svensson, B. 2002. *The starch binding domain of glucoamylase from Aspergillus niger: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis*. Biologia, Bratislava, 57/Supplement 11: 239-245.

Nielsen, E. and Borchert T. 2000. *Protein engineering of bacterial α -amylases*. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 253-274.

Reddy, S., Nimmagadda, A. and Rao, K. R. S.(2003). *An Overview of the microbial α -amylase family*. African Journal of Biotechnology 2: 645-648.

Rodríguez, R., Morlon, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N. and Guyot J. 2000. *Comparative Characterization of Complete and Truncated Forms of Lactobacillus amylovorus α -Amilase and Role of the C-Terminal Direct Repeats in Raw Starch Binding*. Applied and Enviromental Microbiology 66: 3350-3356

Rodríguez, R., Oviedo, N. and Sánchez, S. 2005. *Microbial starch binding domain*. Current Opinion in Microbiology 8:260-267.

Rodríguez, R., Ruiz, B., Guyot, J. and Sanchez, S. 2005. *Starch-Binding Domain Affects Catalysis in Two Lactobacillus α -amylases*. Applied and Enviromental Microbiology 71: 297-302.

Sajilata, G., Singhal, R. and Kulkarni, P., 2006. *Resistant Starch A Review*. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety 5:1-16.

Sanni, A., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J. 2001. *New efficient amylase producing strains of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum isolated from different Nigerian traditional fermented foods*. International Journal of Food Microbiology 72: 53-62.

Santiago, M., Linares, L., Sanchez, S. and Rodríguez, R. 2005. *Functional characteristics of the starch-binding domain of Lactobacillus amylovorus α -amylase*. Biologia, Bratislava 16:111-114.

Shoseyov, O., Shani, Z. and Levy, I. 2006. *Carbohydrates Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70: 283-295.

Smith, A., Denyer, K., and Martin, C. 1997. *The Synthesis of the Starch Granule*. Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology 48:67–87.

Sorimachi, K., Jacks, A., Le Gal-Coeffet, M., Williamson, G., Archer, D. and Williamson, M. 1996. *Solution Structure of the Granular Starch Binding Domain of Glucoamylase from Aspergillus niger by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Journal Molecular Biology 259: 970–987.

Swift, H., Leo B., Zygmunt, J., Dodson, E., Dodson, Guy., Turkenburg, J. and Wilkinson, A. 1991. *Structure and Molecular Model Refinement of Aspergillus oryzae (TAKA) α -amylase: an Application of the Simulated Annealing*. Acta Crystallographica 47: 535-544

Takeo, K. 1984. Affinity electrophoresis: *Principles and applications*. Electrophoresis 5: 187-195.

Tester, R., Karkallas, J. and Qi, X. 2004. *Starch composition, fine structure and architecture*. Journal of Cereal science 39: 151-165.

Van der Marel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. and Dijkhuizen L. 2001. *Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family*. Journal of Biotechnology 94:137-155.

Voet, D. 2004. *Biochemistry*. tercer edición, Edición John Wiley & Sons, INC.

Zhang, D. and Cheryan, M. 1991. *Direct Fermentation of starch to lactic acid by Lactobacillus amylovorus*. Biotechnology Letters 13: 733-738.

Sitios de internet citados:

Cazy, http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html

APÉNDICES

Medio de Cultivo:

Medio MRS con almidón:	g/L
Peptona Pancreática de caseína	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio dibásico ($C_6H_{14}N_2O_7$)	2.17
Acetato de Sodio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	5
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.207
Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.056
Fosfato dibásico de potasio ($K_2 HPO_4$)	2.62
Almidón soluble DIFCO	20

- Soluciones para medir actividad amilolítica de la α -amilasa por el método de yodo-yoduro.

Curva Patrón de Almidón PROLABO:

Tubo	Concentración mg/ml de almidón PROLABO. $\mu\text{g/ml}$	Stock 120 mg/ml en 10ml de Amortiguador Citrato-fosfato pH5 μl	Volumen final de Citrato-Fosfato pH5. μl
1	0	0	100
2	1	8	92
3	2	16	84
4	4	32	68
5	6	48	52
6	8	64	32
7	10	80	20
8	12.5	100	0

- Amortiguador Citrato-Fosfato 0.1M pH 5.5:

A: Ácido Cítrico 0.1M.

B: Fosfato de sodio dibásico 0.2M.

- Stock de yodo-yoduro:

A: KI-15 g y I₂ - 1.5 g pesar y mezclar más 500 ml de agua

B: 4 ml de stock más 96 ml de H₂O (Preparar en el momento que se use).

- ácido sulfúrico 2N:

A: 5.6 ml de ácido sulfúrico al 96% en 100 ml de agua.

Soluciones: A) Amortiguador Citrato-Fosfato pH5 0.1M. B) Stock de 120 mg/ml de almidón PROLABO en 10 ml de amortiguador Citrato-Fosfato pH5. C): KI/I₂ al 4% v/v.

- Electroforesis de Proteínas (BIORAD).

La separación y purificación de proteínas son necesarias para llevar a cabo el estudio y caracterización biológica de proteínas, subunidades y péptidos. El fenómeno de electroforesis ocurre cuando una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. En geles de poliacrilamida las proteínas migran en respuesta de un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel (tamiz molecular). La migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de factores como: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño del poro del gel, tamaño y forma de las proteínas, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (N-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del amortiguador de electroforesis, así como el tratamiento de las muestras. En geles nativos las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga

eléctrica, sino también según su tamaño y forma. En el caso de geles SDS-PAGE cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente (aniónico) SDS, éste se une a las proteínas, proporcionándoles carga negativa.

- Geles de poliacrilamida.

Se ensamblaron en un soporte placas de vidrio de 0.75 mm para formar el gel, se verificarón los niveles de separación de los geles (concentrador y separador) y se comprobó que no hubiera fugas. Se preparó el gel de separación y concentración al porcentaje deseado. Primero se depositó el gel de separación dentro de las placas, aproximadamente de 5-6 cm de altura, debía haber una distancia entre un gel y otro aprox. de 0.75 cm. Se uniformó la superficie del gel con un poco de agua destilada. Una vez que polimerizó el gel se removió el agua destilada de las placas, para posteriormente ensamblar el gel de concentración. El gel de concentración se depositó en las placas y se le puso un peine que dió la forma a 10 pozos. (Se observó que no se formen burbujas dentro de las separaciones entre un gel y otro). Se dejó que polimerizara a temperatura ambiente y posteriormente se retiró el peine. El gel dentro de las placas está listo para la electroforesis. Se recorrió durante 15 a 20 min a 20 mA. Después de precorrer los geles se colocaron las muestras de amilasa pura en los pozos (donde caben 20 µl como máximo).

- Preparación de muestras de amilasa para correr en geles SDS-PAGE.

Se prepararon las muestras de amilasa pura en microtubos. Se disolvieron en amortiguador de muestra 4x. Cada muestra se hirvió a 95 °C durante 5 minutos. Se pusieron en hielo y se centrifugaron 1 min a 13000 rpm para después se cargar en los pozos del gel concentrador.

- Corrimiento de un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli).

Cada gel se corrió a 20 mA, durante un aproximado de 1.5 horas, en la cámara de electroforesis de Bio-Rad con un amortiguador de migración SDS-PAGE 5X pH 8.3.

Tabla 4. Soluciones de Bis/acrilamida al 30%. Volumen para 1 gel SDS-PAGE.

Reactivos	Gel de concentración 5%	Gel de separación 8%	Gel de separación 7.5%
Agua destilada	1.4 ml	2.35 ml	2.45 ml
Tris HCl 0.5M, pH 6.8	0.25 ml	_____	_____
Tris HCl 1.5M, pH 8.8	_____	1.25 ml	1.25 ml
SDS 10%	20 µl	50 µl	50 µl
Persulfato de amonio	20 µl	50 µl	50 µl
Bis / Acrilamida 30%	0.33 ml	1.35 ml	1.25 ml
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl
Total	2 ml	5 ml	5ml

La concentración de poliacrilamida del gel depende del peso molecular de las proteínas que se desean separar. Para proteínas con un peso molecular (PM) de 60 a 200 kDa se utiliza una concentración del 5 %. Para proteínas con un PM de 16 a 70 kDa se utiliza una concentración al 10 %. Para proteínas con un PM de 12 a 45 kDa se utiliza una concentración del 15 %.

Amortiguador 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

Amortiguador de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

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

Soluciones para revelar los geles de poliacrilamida con azul de Coomasie:

Solución Stock I	0.2 % Azul de Coomasie		
Solución Stock II	90 % Etanol y 20% Ácido acético		
Óptimos de revelado:	Etanol	40 %	30 min.
Fijación	Ácido acético glacial	10 %	
Tinción	Stock I	50 %	20 min.
	Stock II	50 %	
	Solución de fijación		1 min.
Destinción	Etanol	20 %	
	Ácido acético glacial	10 %	40 min.

Tabla 5. Soluciones de Bis/acrilamida al 30%. Volumen para un gel nativo (N-PAGE) (Ornstein-Davis, Bio Rad).

Reactivos	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 7.5%
Agua destilada	2.9 ml	5 ml
Tris HCl 0.5M, pH 6.8	1.25 ml	_____
Tris HCl 1.5M, pH8.8	_____	2.5 ml
Persulfato de amonio 10%	100 μ l	100 μ l
Bis/acrilamida 30%	0.8 ml	2.5 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l
Volumen Total	5 ml	10 ml

- Características del gel de Sefarosa epoxi-activada 6B (Pharmacia Biotech) para cromatografía de afinidad acoplada con beta-ciclodextrina como ligando.

Cromatografía de afinidad-Ligando beta-ciclodextrina

Gel: Epoxi-Sefarosa Activada 6B (Pharmacia)

Grupos acoplados: NH, OH, SH

Matriz: 6% de agarosa

Límite de exclusión: 6×10^6 M

Tamaño de Partícula: 45-165 μm

Ligando: beta-ciclodextrina.

Sustitución: 19-40 $\mu\text{mol epoxy/ml}$ gel seco.

- Inmovilización de la beta-ciclodextrina en el gel de sefarosa Epoxi-activada 6B.

Se suspendió 4g de Sefarosa epoxi-activada 6B en 25 ml de agua destilada (1h). Se lavó en un filtro whatman del No. 3 (1 hora con H₂O destilada). Se transfirió el gel en 25 ml de una solución de NaOH 0.1M. Se eliminó el exceso de líquido. Se añadió 12 ml de solución de NaOH 0.1 M, que contenga 30 mM de beta-ciclodextrina (Sigma). El gel y la solución NaOH 0.1 M con beta-ciclodextrina se mezclaron. Se dejó agitar por 19.5 horas a 45°C (se evitó agitación magnética). Para bloquear grupos activos restantes se transfirió el gel a un amortiguador de etanolamina-HCl pH8,1 M. Se dejó a 40-50°C toda la noche en incubadora. Se lavó con agua destilada durante 30 min y se bloquearon los radicales libres con 200 ml de glucosa al 2.5 % por 30 min. Se hicieron 3 lavados sucesivos con:

100 ml de Amortiguador Borato 0.1 M pH8, NaCl 0.5 M.

100 ml de Ácido acético 0.1 M pH4, NaCl 0.5 M.

Al final se hizo pasar al gel de sefarosa 100 ml de amortiguador Citrato-Fosfato pH 5.5, 0.1 M con beta-ciclodextrina y se dejó en refrigeración con Citrato-Fosfato 0.1 M pH 5.5 y 1 M de NaCl.

- Preparación del amortiguador Citrato-Fosfato pH 5.5, 0.1 M de lavado y elución.

Soluciones del amortiguador Citrato Fosfato 0.1 M pH 5.5:

A: 0.1M Ácido Cítrico (19.21g en 1000 ml). B: 0.2 M Fosfato de Sodio dibásico (53.65g de HPO_4 $7\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml). 24.3 ml de solución A más 25.7 ml de solución B en un total de 100 ml a pH 5.5.

Elución: 8 mM de beta-ciclodextrina considerando que son 9 mg/ml, en un volumen de 70 ml de Citrato-Fosfato 0.1M pH 5.5.

- Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (BIO-RAD).

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford involucra la adición a las proteínas, de un colorante ácido como es el azul de Coomassie G-250, a las proteínas en solución. Las proteínas se unen al colorante azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (desde 10-50 μl de muestra), simple y rápido. El colorante se une específicamente a los aminoácidos básicos y ácidos de la proteína los cuales resultan en un cambio de la absorbancia de 465 nm (café claro) a 595nm (azul). Entre las sustancias que pueden interferir son detergentes y soluciones básicas. Se utiliza para determinar la cantidad de proteína de las muestras una curva patrón de albúmina bovina o caseína.

- Metodología de Microbradford (Bio-Rad).

Se prepararon diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar a partir de un Stock (1 mg/ml de BSA, SIGMA), se hizo una curva patrón.

Tubo	($\mu\text{g/ml}$ BSA)	Stock BSA: 1 mg/ml, (μl)	Agua destilada (μl)	Solución Bradford (μl)
1	0	0	800	200
2	1	1	799	200
3	2	2	798	200
4	4	4	796	200
5	6	6	794	200
6	8	8	792	200
7	10	10	790	200

Se agregaron 200 μl de solución Bradford a cada tubo y se agitó en vórtex. Se incubó la reacción por 5 min a temperatura ambiente. Se leyó absorbancia a 595 nm. Una vez obtenidos los datos de absorbancia se obtuvo una pendiente (m) y ordenada al origen (b) de la relación (11).

- Cuantificación de muestras con MicroBradford.

Se tomaron seis tubos y en cada uno se puso una muestra de 50 μl de amilasa (antes de la purificación y después de la purificación) por triplicado con su respectivo blanco. Se agregó agua y 200 μl de solución Bradford para un volumen final de 1000 μl . Se agitó en vórtex, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó absorbancia a 595 nm. Los datos obtenidos se extrapolaron en la pendiente (m) obtenida de la relación (12) y la ordenada al origen (b).

$$y = mx + b \quad (11)$$

Donde:

y = densidad óptica (595 nm)

m = pendiente.

X = concentración de proteína total ($\mu\text{g/ml}$).

b = ordenada al origen.

$$\text{Quedando: } x = \frac{y-b}{m} \quad (12)$$

Tabla 6. Soluciones de Bis/acrilamida al 30% y polisacáridos. Volumen para 1 gel de electroforesis de afinidad PAGE-AGE (BIO RAD).

Reactivos	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 7.5 %				
		0.01%	0.05%	0.1%	0.5%	1%
Concentración en % del polisacárido	_____					
Agua destilada	1.4 ml	2.475 ml	2.375 ml	2.25 ml	1.25 ml	0 ml
Tris-HCl 1.5M, pH8.8	_____	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
Polisacárido (stock 2%) ml	_____	0.025 ml	0.125 ml	0.25 ml	1.25 ml	2.5 ml
Tris-HCl 0.5M, pH6.8	0.25 ml	_____	_____	_____	_____	_____
Persulfato de amonio 10%	20 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Bis/acrilamida 30%	0.33 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
TEMED	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl
Volumen Total	2 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

- Electroforesis de afinidad con almidón y diferentes polisacáridos.

La electroforesis de afinidad en geles (AGE) por sus siglas del inglés *Afinity Gel Electrophoresis*, es utilizada para verificar interacciones específicas entre dos sustancias en un gel. Esta interacción denota un cambio en la migración entre una sustancia electroforética (proteína) y otro componente embebido presente en el medio (ligando). La migración de la primera sustancia es inversamente proporcional a la concentración de la segunda sustancia. En geles de migración la proteína se retarda por la interacción con el sustrato. Para cuantificar las interacciones es indispensable la aplicación de un parámetro que mida la interacción entre dos sustancias. En un gel de electroforesis de afinidad, el parámetro es una K_d = constante de disociación que permite registrar, en este caso la magnitud en el cambio de migración de una sustancia (proteína) con respecto a la concentración de la otra sustancia ligando en el gel (Takeo, 1984; Horejsi, 1986).

- Geles de retardo

Se mezcla en un tubo la cantidad de un polisacárido en agua y amortiguador Tris HCl 1.5 M pH 8.8 en el volumen final que se muestra en la tabla 6, hasta que se observara la mejor solubilidad, si era necesario se calentó un poco en el microondas, (observar que los líquidos no lleguen al punto de ebullición). Una vez disuelto el polisacárido en el agua y en el amortiguador Tris HCl 1.5 M pH 8.8 se le agregaron los reactivos restantes que aparecen en la tabla 6. Se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente (de 10-15 min). Finalmente se preparó el gel concentrador sin polisacárido como aparece en la tabla 6. Se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente.

- Preparación de seis muestras de proteína (amilasa) y BSA, para cargar en cinco geles de electroforesis de afinidad (con diferente concentración de un polisacárido) y un gel nativo.

De las fracciones puras se midió absorbancia a 280 nm y se concentró la proteína a la mitad del volumen inicial en un Speed Vac (SPD1010, System), mediante la aplicación de vacío. Se recuperó la proteína concentrada y se dializó en membranas de tamaño de corte de 10000 Da. Un

microtubo se cortó en tres cuartas partes hacia la parte de la tapa. Se recuperó esta parte y se puso el volumen de proteína en la tapa volteada. Se tapó con 2-3 cm de membrana, la tapa y parte del tubo sirvieron como soporte. Se dejó dializando en agitación magnética con 35-40 ml de amortiguador citrato-fosfato 0.1 M pH5.5 por 15 min, en un matraz de 200 ml. Después del tiempo de diálisis se cambió el amortiguador de diálisis y se repitió el procedimiento de diálisis durante 15 min.

Se recuperaron las tapas con la proteína dializada y se midió su absorbancia a 280 nm. Se aplicó la relación (4). Si es necesario se volvían a concentrar mediante vacío en el Speed Vac. Se cargaron en el gel de retardo 10 μg de amilasa en un pozo y en otro pozo 3 μg de albúmina sérica bovina (BSA, Stock 2 mg/ml). A cada una de las muestras de amilasa y BSA se le agregó (4 μl) de amortiguador de muestra 4x, sin beta-mercaptoetanol y sin SDS.

Se prepararon seis geles, cinco con diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml) para cada polisacárido en uso y un gel nativo sin polisacárido, como control. Todos los geles se corrieron a 4°C en una corrida y a 20 mA para cada gel. Se observó la corrida y se detuvo antes de que saliera el frente de los geles (azul de bromofenol). Se midió la distancia de migración en centímetros (cm) de la amilasa desde el límite inferior del pozo donde se cargó, hasta donde se retuvo la amilasa en cada uno de los geles. Los datos se analizaron y calcularon con la relación (3) de Takeo, 1984, la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).