



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

### **INMOVILIZACIÓN DE ANTÍGENOS EN ALMIDÓN INSOLUBLE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Daniel Alejandro Guillén Santos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Romina Rodríguez Sanoja.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Amelia Farrés González-Saravia      Facultad de Química, UNAM

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón              Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# INMOVILIZACIÓN DE ANTÍGENOS EN ALMIDÓN INSOLUBLE

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (0131149), DGAPA-UNAM (IN209410) y DGAPA-UNAM (IN-222113). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (177039) y un apoyo para la titulación DGAPA-UNAM durante la escritura de la tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día .....

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Clarita Olvera Carranza	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Laura Palomares Aguilera	Instituto de Biotecnología, UNAM

## CONTENIDO

Carátula .....	1
Reconocimientos .....	2
Contenido .....	3
Abreviaturas .....	4
Resumen .....	5
Introducción .....	6
Capítulo Primero. Antecedentes .....	8
Justificación .....	24
Objetivo del estudio .....	25
Capítulo Segundo. Relevancia de los módulos de unión a carbohidrato .....	26
Capítulo Tercero. SBD <sub>tag</sub> como etiqueta de afinidad para la purificación de proteínas recombinantes .	36
Capítulo Cuarto. Micropartículas de almidón para la administración oral de antígenos .....	45
Capítulo Quinto Estudio de un segundo esquema de administración de micropartículas de almidón	52
Discusión General .....	59
Conclusiones .....	64
Referencias .....	65

## ABREVIATURAS

SBD	Dominio de fijación al almidón (Starch-binding domain)
SBD <sub>tag</sub>	Dominio de fijación al almidón derivado de la $\alpha$ -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>
CBM	Módulos de Unión a Carbohidrato (Carbohydrate binding module)
TetC	Fragmento C de la toxina tetánica de <i>Clostridium tetanii</i>
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
GFPSBD <sub>tag</sub>	Fusión entre la GFP y el SBD <sub>tag</sub>
TcSBD <sub>tag</sub>	Fusión entre TetC y el SBD <sub>tag</sub>

## RESUMEN

Los dominios de unión al almidón son proteínas que se adsorben específicamente al almidón insoluble. Al fusionar este dominio a otras proteínas, se transfiere la capacidad de unión al almidón. En este trabajo, las aplicaciones biotecnológicas que derivan de esta propiedad son exploradas y analizadas.

Primero, se evaluó si la capacidad de unión al almidón de las proteínas de fusión era suficiente para separar a la proteína de una mezcla compleja, permitiendo su purificación. Se encontró que el sistema permite la purificación de las proteínas de fusión sobre gránulos de almidón con una alta eficiencia. Al comparar contra uno de los sistemas de purificación más usados como el hexapéptido de histidinas, se observó que el dominio de unión al almidón (SBDtag) permitió, en todos los casos probados, obtener una mayor cantidad de la proteína de fusión con alta pureza.

El almidón es un soporte atractivo para la inmovilización de proteínas por su inocuidad, abundancia, naturaleza microparticulada, además de su amplio uso en la industria farmacéutica y dado que, el SBDtag permite la inmovilización al almidón de prácticamente cualquier proteína, se consideró utilizar a los gránulos de almidón como un vehículo para la administración oral de proteínas antigénicas o terapéuticas.

Para probar el sistema, se realizó una fusión con el fragmento C de la toxina tetánica, la cual se fijó a gránulos de almidón que fueron administrados a ratones por vía oral sin ningún adyuvante. Los resultados demuestran que la inmovilización favorece la inducción de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno. La protección a tétanos también fue evaluada retando con la toxina tetánica a dosis letal 100, los animales inmunizados con el fragmento C inmovilizado presentaron un retardo en la aparición de síntomas de tétanos comparado con los animales inmunizados con la proteína libre.

Los resultados encontrados demuestran el potencial del sistema para ser aplicado en diferentes ámbitos de la Biotecnología. En este trabajo dos aplicaciones fueron demostradas: en la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes y en biotecnología farmacéutica al comprobar la capacidad del sistema como vehículo para la administración oral de antígenos inmovilizados.

## INTRODUCCION

La  $\alpha$ -amilasa perteneciente a *Lactobacillus amylovorus*, una bacteria láctica aislada a partir de desperdicios de maíz en E.U.A. [1], es una enzima que posee un inusual dominio de fijación al almidón (SBD) compuesto por múltiples módulos de unión a carbohidrato (CBM). Estudios previos realizados para entender las características y funcionalidad de este SBD demostraron su capacidad de este dominio para adsorberse específicamente a gránulos de almidón insoluble [2, 3]. Además, la afinidad de este SBD puede ser controlada y variar hasta en un orden de magnitud modificando el número de módulos que lo constituyen, [4].

La capacidad de adsorción al almidón puede ser transferida a otras proteínas, lo cual se demostró al fusionar el SBD y la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína resultante es capaz de adsorberse al gránulo de almidón y además conservar la capacidad de fluorescer lo cual indica que la fusión del SBD no afecta el plegamiento de la proteína a la cual se fusiona [5].

Los resultados obtenidos con la fusión GFPSBD, apuntan hacia el amplio potencial que puede tener el SBD como dominio auxiliar para la inmovilización de proteínas, con aplicaciones tanto para la industria como para la investigación. Se podría emplear, por ejemplo, en inmovilización celular, biorremediación o como herramientas analíticas o de diagnóstico. Dentro de las aplicaciones sugeridas, una de las más promisorias y claras es la utilización del SBD como un dominio o etiqueta de afinidad peptídico para la purificación de proteínas recombinantes en un soporte económico como lo es el almidón. Otra posible aplicación sería la inmovilización de proteínas sobre gránulos de almidón, ya sea para estabilizarlas o bien, para utilizar el almidón como un vehículo de administración oral de péptidos o antígenos ya que este biopolímero cuenta con características como inocuidad, biocompatibilidad y un tamaño en el rango de las micropartículas, características ideales para este tipo de usos.

El antecedente más cercano al uso de micropartículas de almidón como vehículo de administración oral de proteínas se refiere a la unión covalente de antígenos en micropartículas de maltoligosacáridos acrilados. Este sistema demostró su efectividad como acarreador y adyuvante [6]. Sin embargo, este sistema es contaminante y costoso debido al uso de acrilamida y solventes en su elaboración [7], además de que su bioseguridad puede ser cuestionable.

La alternativa que se propone en este trabajo es la de emplear el dominio de fijación al almidón para generar proteínas de fusión que puedan adsorberse a los gránulos de almidón. De esta manera, la

inmovilización en la superficie del gránulo de almidón estabiliza a las proteínas y ayuda a que resistan en su paso por el tracto gastrointestinal, esto favorece la captura de los gránulos cargados de proteína por células especializadas en transporte de micropartículas en el intestino y conduce al reconocimiento de las proteínas exógenas por los elementos del sistema inmune que se localizan por debajo del epitelio intestinal, a fin de despertar una respuesta humoral.

Así, el objetivo general fue establecer el potencial biotecnológico y biomédico de un Dominio de fijación al almidón derivado de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* (SBD<sub>tag</sub>). El potencial se estableció a través de dos objetivos particulares: 1) La capacidad del sistema para ser utilizado como etiqueta para la purificación de proteína recombinante y 2) La capacidad del sistema de inmovilización para proteger proteínas en su paso por el tracto gastrointestinal y favorecer su presentación al sistema inmune, lo que constituiría el primer paso para el desarrollo de un sistema de entrega de proteínas o péptidos en mucosa intestinal.

En el primer capítulo se plantean los antecedentes e información obtenida con trabajos previos realizados con el SBD<sub>tag</sub> así como los diferentes métodos y técnicas a los cuales se pretende aplicar el sistema de SBD<sub>tag</sub>-almidón resaltando las ventajas que su uso implica.

El segundo capítulo presenta una revisión acerca de las propiedades y el papel biológico de los módulos de unión a carbohidrato en general, como un acercamiento inicial a la función y los mecanismos involucrados en el reconocimiento e interacción proteína-carbohidrato.

En el tercer capítulo se muestra específicamente la aplicación del SBD<sub>tag</sub> como dominio o etiqueta de afinidad para llevar a cabo la purificación de proteínas de fusión utilizando como soporte almidón o análogos de este y comparando la eficiencia del sistema con una de las etiquetas más usadas en biotecnología, como lo es la etiqueta de histidinas.

Las aplicaciones del SBD<sub>tag</sub> se complementan con los capítulos cuarto y quinto, donde se muestra el uso de este dominio para inmovilizar proteínas al gránulo de almidón y su viabilidad como un vehículo de antígenos vía oral para la inducción de respuesta inmune bajo dos distintos esquemas de inmunización.

Finalmente, se presenta una discusión general de los resultados obtenidos con los distintos ensayos que se llevaron a cabo con el SBD<sub>tag</sub>, enumerando las ventajas que el sistema puede ofrecer sobre los métodos actualmente empleados tanto en purificación/inmovilización de proteínas y los soportes utilizados como vehículos orales para la administración de proteínas o péptidos.



## ANTECEDENTES

### 1. Almidón

El almidón es un polímero de glucosas unidas una a otra a través del oxígeno del C1 y C4 formando un enlace  $\alpha$ -1,4 y con un grupo aldehído que forma el extremo reductor al final de la cadena polisacárida. En las plantas, el almidón es el principal carbohidrato de reserva, encontrándose en tubérculos (papa, yuca), legumbres (garbanzo), cereales (maíz) y se diferencia de otros polisacáridos presentes en la naturaleza en que se arregla como un conjunto de partículas o gránulos localizados en organelos llamados amiloplastos. Estos gránulos varían en tamaño dependiendo de su origen botánico, en un rango que va desde  $\approx 2\mu\text{m}$  hasta  $\approx 100\mu\text{m}$  y son relativamente densos e insolubles en agua fría, aunque pueden dar lugar a suspensiones cuando se dispersan en el agua [8].

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  $\alpha$ -1,4. La proporción de este polímero varía respecto al origen del almidón, el contenido típico de amilosa es de 15 a 25% y no es esencial en la formación del gránulo [8, 9].

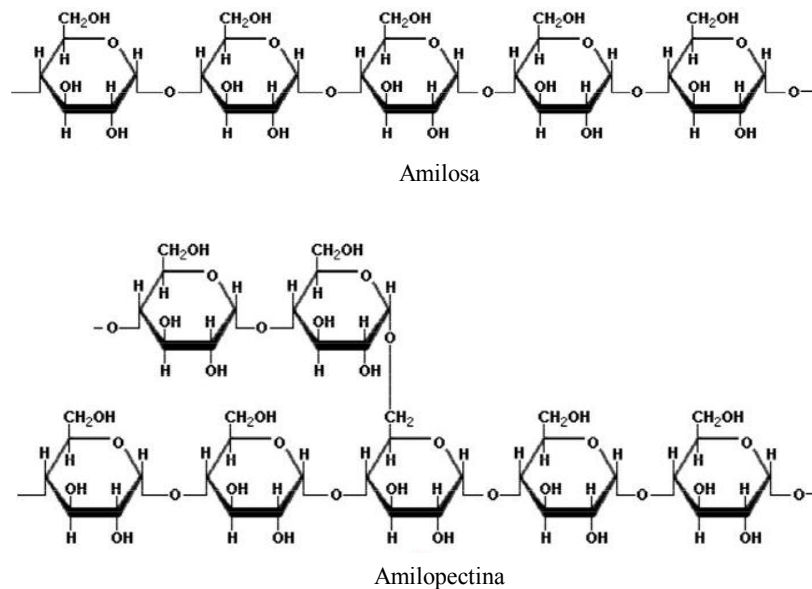


Fig. 1: Representación de los dos polímeros de glucosa que se encuentran en el almidón. Arriba la amilosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y abajo la amilopectina con enlaces  $\alpha$ -1,4 y ramificaciones unidas a través de enlaces  $\alpha$ -1,6.

Por otro lado, la amilopectina es un polímero ramificado que consiste de cadenas lineales de aproximadamente 10 a 60 unidades de glucosa de longitud que están unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y cadenas laterales de 15 a 45 residuos de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación (Fig. 2A). La molécula completa de amilopectina contiene aproximadamente 2 000 000 unidades de glucosa, lo que la convierte en una de las más largas en la naturaleza y se encuentra en una proporción de 75 a 85% del almidón total [8].

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 (Fig. 2C) [10]. 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. 2B).

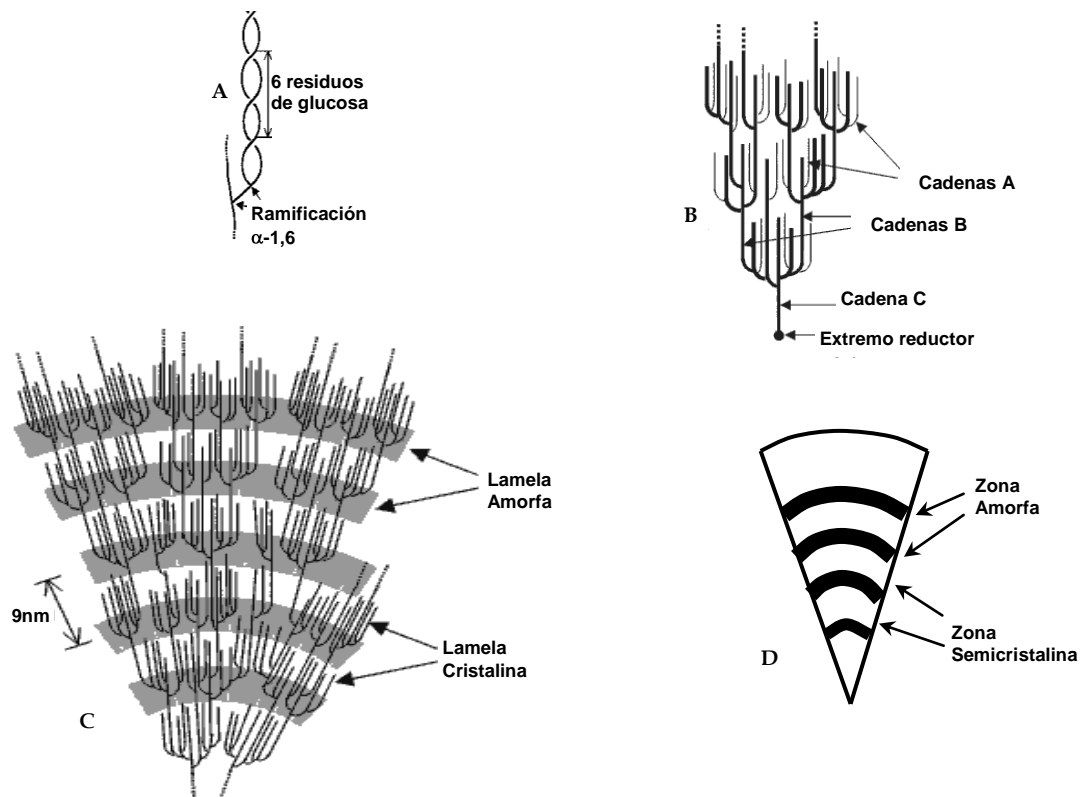


Fig.2: Organización del gránulo de almidón. A) Representación de los enlaces  $\alpha$ -1,6 en el polímero de glucosa. B) Organización de la molécula de amilopectina. C) Modelo de cluster de la amilopectina en la zona semicristalina. D) Corte de un granulo de almidón mostrando los anillos de crecimiento consistentes de regiones semicristalinas y amorfas. ([www1.lsbu.ac.uk/water/hysta.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/hysta.html)).

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 [9].

La cristalinidad está asociada con el arreglo que presentan las dobles hélices de la amilopectina, y se ha clasificado con base en su patrón de difracción de rayos-X [11]. Los almidones tipo A presentan cristales empaquetados de manera escalonada, lo que da como resultado una estructura más densa; por otra parte los almidones tipo B presentan un acomodo hexagonal que es más fácil de ser hidratado (Fig. 3) [12]. 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 [11], además existe un tipo C que realmente es una mezcla de los tipos A y B y es típico de algunas legumbres como frijol y chícharo [13].

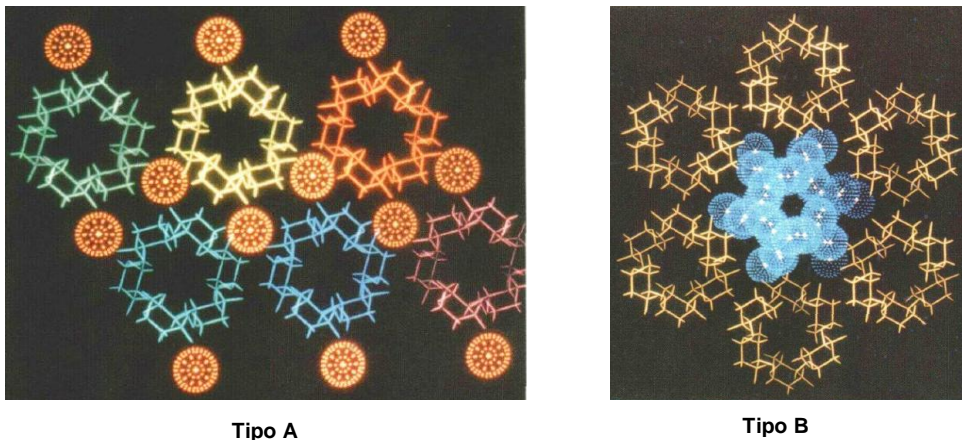


Fig. 3: Esquema de los dos distintos tipos de cristales de almidón. Se observa que el tipo B presenta un acomodo hexagonal al centro del cual se forma una cavidad, lo cual facilita su hidratación (moléculas de agua en azul) en comparación con los cristales tipo A (moléculas de agua en rojo) [11].

En los gránulos de almidón, 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.

## 2. Las $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -amilasas. Consiste en una estructura simétrica de ocho láminas- $\beta$  paralelas arregladas en forma de barril y rodeadas por ocho  $\alpha$ -hélices. Esta estructura ha sido determinada por cristalografía con rayos-X en varios miembros de la familia de las  $\alpha$ -amilasas [14]. El barril  $(\beta/\alpha)_8$  primeramente fue observado en la triosa fosfato isomerasa de músculo de pollo [15] y por tanto es también conocido como barril TIM (Fig. 4).

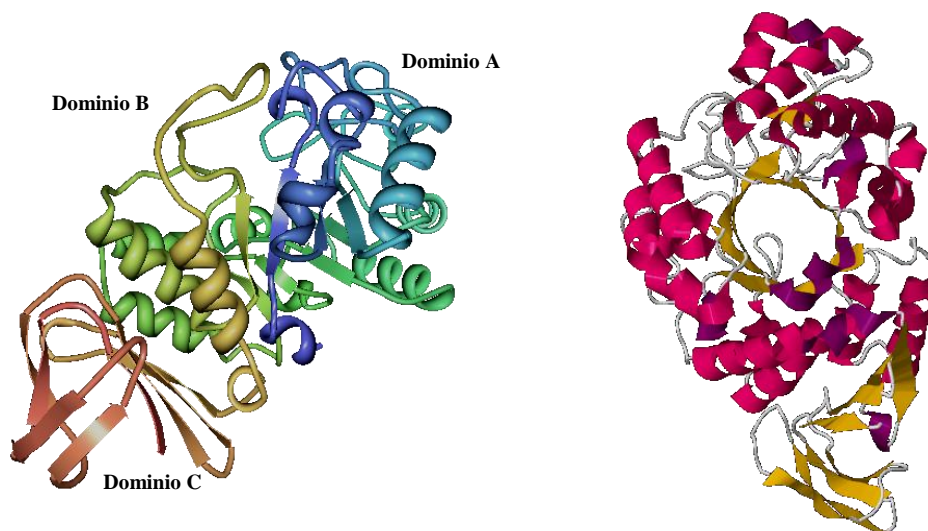


Fig. 4: Izquierda, modelo de la estructura correspondiente a la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus plantarum* con los dominios A, B, C. A la derecha, estructura del dominio catalítico de la misma amilasa con el arreglo de barril  $(\beta/\alpha)_8$  característico del dominio A de la familia de las  $\alpha$ -amilasas.

En la mayoría de las  $\alpha$ -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 precediendo al dominio catalítico que se conocen como dominio N [16]. El dominio N no es estructuralmente idéntico en todas las enzimas, aunque en algunos casos, como el de la  $\alpha$ -amilasa I de *Thermoactinomyces vulgaris*, se ha mostrado que puede actuar como un dominio de unión a sustrato [17].

En el dominio A existen segmentos que unen las láminas- $\beta$  a las hélices adyacentes del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, 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 segmento largo entre la tercera lámina- $\beta$  y la tercer  $\alpha$ -hélice, al que se le conoce como dominio B, el cual varía ampliamente en longitud, secuencia y estructura terciaria entre las diferentes amilasas [14].

Posterior al barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> se encuentra el dominio C, el cual está formado por láminas- $\beta$  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 [18]. Finalmente, algunas enzimas de la familia de las amilasas contienen uno o dos dominios adicionales en la porción C-terminal después del dominio C, los cuales se pliegan en láminas- $\beta$ , estos son conocidos como dominios D y E [19].

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 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 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, el cual facilita la degradación de los gránulos del almidón en las enzimas que lo contienen [20].

## **2.1 La $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.**

*L. amylovorus* es una bacteria láctica perteneciente al grupo de las bacterias Gram-positivas y que, junto con otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones vegetales, puede utilizar al almidón como fuente de carbono. Algunos ejemplos de estas bacterias son *L. plantarum* la cual se aisló de raíz de yuca fermentada en el Congo y Nigeria [21], *L. manihotivorus* que fue aislada de harina agria de mandioca en Colombia [22], *L. amylovorus* y *L. amylophilus* que se aislaron de desperdicios de maíz en EE.UU. [1, 23], etc. Entre las amilasas que se han caracterizado se encuentran las de *L. plantarum*, *L. manihotivorus* y *L. amylovorus*, todas muestran actividad óptima a pH cercano a 5 y una temperatura óptima alrededor de 60-65°C [24-26].

El estudio de las  $\alpha$ -amilasas de *L. plantarum* y de *L. amylovorus* mostró que ambas son capaces de hidrolizar al almidón insoluble [27, 28], aunque con diferente eficiencia [29]. La comparación de las secuencias de los genes codificantes para las  $\alpha$ -amilasas de *L. amylovorus* (U62096), *L. plantarum* (U62095) y *L. manihotivorus* (AF126051) [30] mostró una identidad del 98%. Las tres  $\alpha$ -amilasas son de aproximadamente 100 kDa, lo que es casi el doble de las amilasas en general (50-60 kDa).

La estructura de los genes de las tres amilasas puede dividirse en dos partes: (i) Una 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 repetidas, idénticas y directas de 273 nucleótidos cada uno; cuatro módulos en las  $\alpha$ -amilasas de *L. plantarum* y *L. manihotivorans* y cinco en el caso de *L. amylovorus* (Fig. 5).

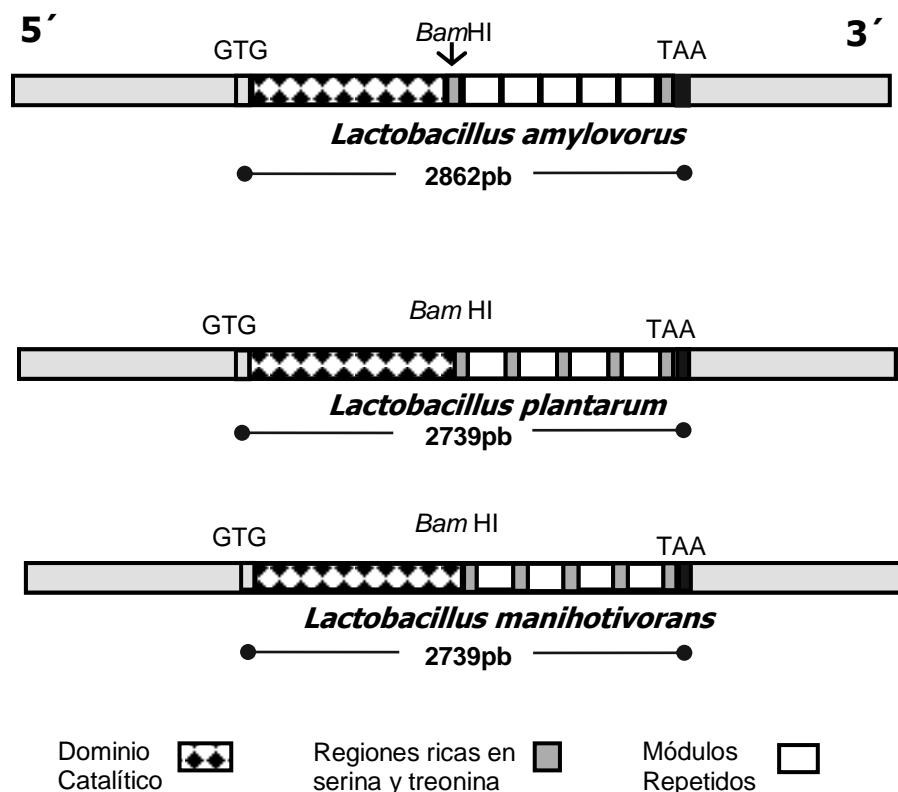


Fig. 5: Representación de los genes de las  $\alpha$ -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, donde la primera mitad del gen (codón GTG a sitio de corte *Bam*HI) codifica para el dominio catalítico y la segunda para el SBD. El SBD de *L. amylovorus* presenta 5CBM mientras que los de *L. manihotivorans* y *L. plantarum* contienen 4CBM con regiones ricas en serina y treonina intercaladas entre cada CBM.

Estudios realizados con el dominio catalítico de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* aislado del resto de la enzima, es decir, sin la presencia de los módulos repetidos, demostraron que la enzima truncada puede hidrolizar almidón soluble, pero la capacidad de adsorberse y de hidrolizar almidón insoluble solo se tiene en presencia de las secuencias repetidas, concluyendo que los 5 módulos forman un dominio de unión al almidón (Fig. 6) [3].

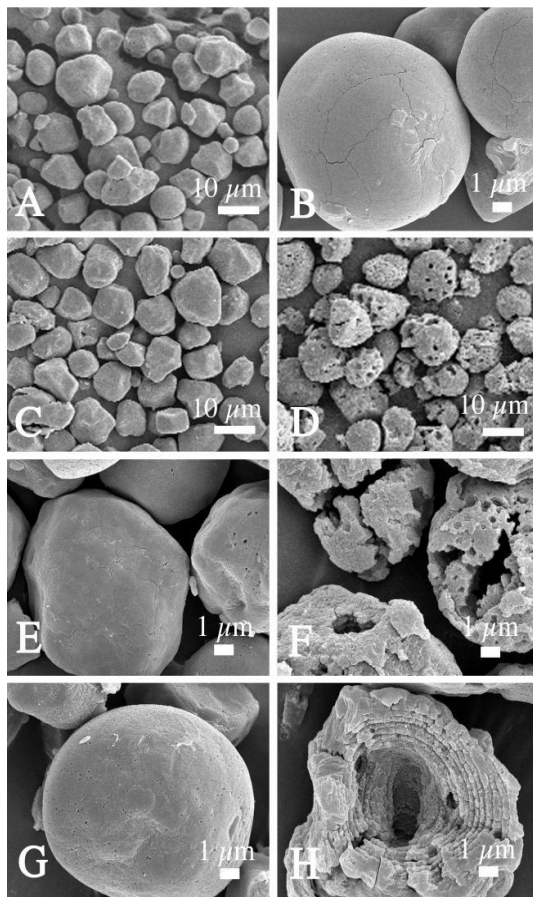


Fig 6: Micrografía electrónica de barrido donde se muestran gránulos de almidón de maíz (A y B) y su estado después de ser incubados por 24 h (D y F) y 48 h (H) con una cepa recombinante de *L. plantarum* que produce la amilasa completa (imágenes de la columna derecha); o incubados por 24 h (C y E) y 48 h (G) con *L. plantarum* que produce la amilasa truncada (imágenes de la columna izquierda) [3].

Por otro lado al trabajar con los cinco módulos aislados del dominio catalítico, se observó que son capaces de adsorberse al almidón insoluble y que incluso lo hacen con mayor afinidad que en la amilasa completa [4]. Además, al realizar ensayos de adsorción con solo un módulo aislado, se encontró que era capaz de adsorberse al almidón insoluble, aunque en menor medida que la amilasa completa y los 5 módulos juntos. En pruebas realizadas sobre la adsorción de 1,2,3, y 5 módulos aislados del dominio catalítico, se observó que la afinidad por el almidón aumenta en función del número de módulos y de manera sinérgica [2, 4]. Estos resultados demostraban que un solo módulo es un CBM y constituye en sí mismo un “Dominio de fijación al almidón”. Para facilitar la lectura nos referiremos a los 5 CBM juntos como un SBD y cuando se hable de los módulos por separado como CBMs.

## 2.2 El SBD de la $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Hasta el momento se conocen pocos casos de enzimas amilolíticas con múltiples CBM, por ejemplo el de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp.* no. 195 con dos CBM [31], la amilasa productora de maltohexaosa de *Bacillus halodurans* con dos CBM [32], la amilasa productora de maltopentosa de una bacteria alcalófila con tres CBM putativos [33] y la  $\alpha/\beta$ -amilasa de *Bacillus polymyxa* con dos CBM igualmente putativos [34], sin embargo, en los casos descritos los

módulos repetidos presentan diferencia tanto a nivel de secuencia nucleotídica como en su secuencia primaria sin llegar a ser idénticos como sucede con los cinco CBM de la amilasa de *L. amylovorus*.

Los CBM se pueden clasificar con base en su secuencia primaria en diferentes familias [35]. De las 71 familias reportadas hasta la fecha, los SBD se pueden encontrar en doce de ellas: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48, CBM53, CBM58, CBM68 y CBM69 (Carbohydrate Active Enzymes database, URL <http://www.cazy.org/>). En cuanto a los CBM de la amilasa de *L. amylovorus*, estos pertenecen a la familia CBM26. La única estructura resuelta hasta este momento para un CBM26 pertenece a la de la amilasa productora de maltohexaosa de *B. halodurans* (PDB 2C3H), donde se aprecia un arreglo de  $\beta$ -sandwich, que es la estructura común a todos los CBM que unen almidón (Fig. 7). En la estructura mencionada, la base de la unión esta mediada por los residuos Trp<sup>36</sup>, Tyr<sup>23</sup> y Tyr<sup>25</sup>. El Trp<sup>36</sup> y la Tyr<sup>25</sup> forman interacciones hidrofóbicas con dos anillos de piranosa del sustrato, mientras que la Tyr<sup>23</sup> se encuentra formando un puente de hidrógeno con el O6 del azúcar que interacciona con la Tyr<sup>25</sup> junto con la Gly<sup>76</sup>, la Glu<sup>77</sup> que forma puentes de hidrógeno con el O3 y O2 del mismo azúcar y ayudando a estabilizar la unión se encuentra la Gln<sup>71</sup> que forma puentes de hidrógeno con el O2 y O3 del azúcar que interacciona con Trp<sup>36</sup> (Fig. 7).

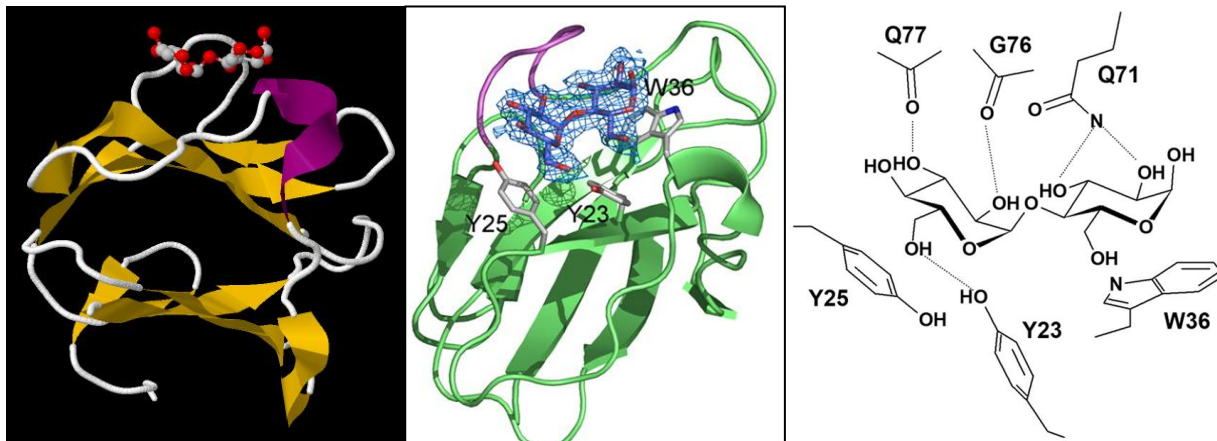


Fig. 7: De izquierda a derecha, 1. Representación de la estructura  $\beta$ -sandwich de la amilasa productora de maltohexaosa de *B. halodurans* (PDB 2C3H) 2. Imagen de la enzima con los residuos aromáticos que intervienen en la unión a carbohidrato (en azul) 3. Esquema representando las principales interacciones que se dan entre el sustrato y los residuos involucrados en su reconocimiento.

Entre el CBM26 de la enzima de *B. halodurans* y los CBM26 de la amilasa de *L. amylovorus* existe una similitud en secuencia del 32%, donde se ha visto que residuos aromáticos involucrados en la unión a sustrato se encuentran conservados (Fig. 8). En estudios de mutagénesis sitio-dirigidas, se demostró la importancia de tres residuos aromáticos en el fenómeno de adsorción a sustrato. Cuando se mutaron la Tyr<sup>18</sup> o la Tyr<sup>20</sup>, la afinidad por el sustrato se vio disminuida, pero al mutar al Trp<sup>32</sup>, la unión se vio totalmente abolida, lo que demuestra que es este el residuo crítico involucrado en la adsorción al almidón [36].



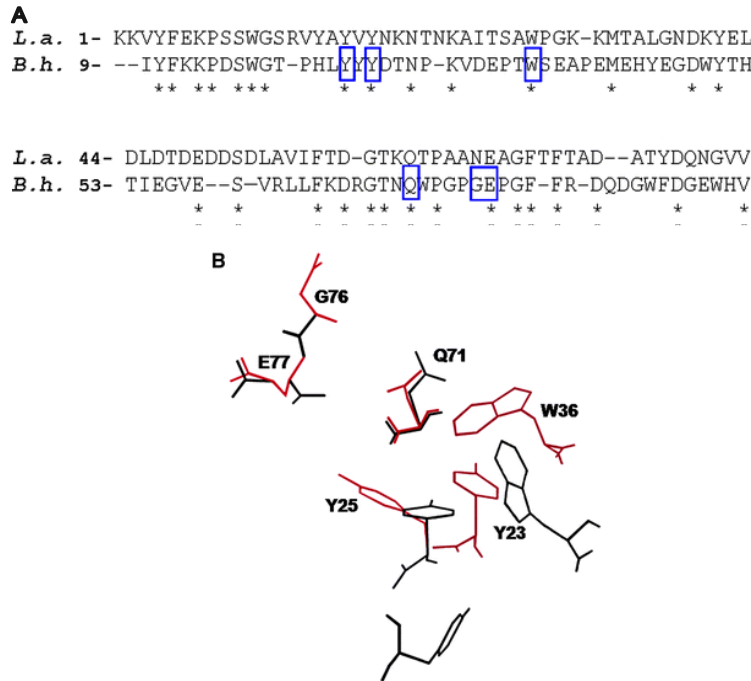


Fig. 8: **A** Alineamiento de la secuencia de un CBM del SBD de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* y la amilasa de *B. halodurans* C-125. Los residuos conservados se indican con \* y los residuos involucrados en la unión se encierran en rectángulo. **B** Sobrelapamiento de los residuos involucrados en la unión (modelados con Rosetta). Los del CBM de *B. halodurans* C-125 se muestran en rojo y los del CBM de *L. amylovorus* en negro.

También se ha probado la afinidad por distintos polisacáridos, observándose que un CBM de la amilasa no solo es capaz de unirse a su sustrato natural, el almidón, sino que además reconoce los polisacáridos que lo conforman como la amilosa y la amilopectina y otros carbohidratos más ramificados como el pululano y el glicógeno. Como era de esperarse, en pruebas con celulosa o xilano no se presentó reconocimiento del sustrato, demostrando la especificidad del CBM por los enlaces presentes en los distintos polisacáridos [36].

#### 4. Inmovilización de proteínas

La inmovilización de proteínas es un proceso comúnmente empleado en diversas aplicaciones biotecnológicas buscando un mejor desempeño o la estabilización de enzimas [37, 38], también se emplea la inmovilización de moléculas bioactivas como antígenos, anticuerpos o proteínas terapéuticas para sistemas de transporte *in vivo* de dichas moléculas [39].

Al inmovilizar una proteína en un soporte, se busca un método que sea efectivo y económico, pero sobre todo que no afecte la actividad biológica de la proteína. Los métodos empleados para la inmovilización pueden ser físicoquímicos

o biológicos, e idealmente deben permitir la inmovilización de la proteína de interés en un solo paso de manera homogénea, estable y con alta densidad sobre una matriz o soporte y reteniendo la función o actividad [40].

De manera general, los métodos comúnmente empleados para la inmovilización de proteína aprovechan los grupos funcionales presente en los residuos de aminoácidos que conforman una proteína o bien las propiedades fisicoquímicas de adsorción de ciertos sustratos, aunque nuevas tecnologías explotan también la afinidad que las proteínas pueden tener por ciertos ligandos que ya se encuentran inmovilizados o por medio de reacciones enzimáticas que forman enlaces covalentes.

#### **4.1 Métodos de inmovilización fisicoquímicos**

Entre los métodos de inmovilización no específicos, se encuentran los que involucran interacciones de tipo no-covalentes como la interacción electrostática en superficies con carga, por ejemplo, las que se dan en las placas cubiertas con polilisina o bien, la adsorción pasiva en matrices hidrofóbicas como las membranas de nitrocelulosa o los microplatos de poliestireno. La ventaja que presenta este tipo de inmovilización es que no necesita de agentes químicos adicionales ni de modificaciones en la proteína. Por lo tanto estos métodos suelen ser sencillos de emplear y aplicables a la mayoría de las proteínas, tanto nativas como modificadas. Sin embargo, este tipo de interacciones suele ser relativamente débiles o reversibles, lo que puede generar pérdida de proteína por su separación de la matriz. Además la adsorción en la superficie del sustrato puede resultar en cambios conformacionales indeseados en la proteína y pérdida de la actividad biológica [41, 42]. Por ejemplo, en estudios de antigenicidad de IgG<sub>1</sub> se reportó que el reconocimiento de esta inmunoglobulina es mayor cuando se encuentra no adsorbida en comparación que cuando esta adsorbida a silicon o poliestireno, e incluso no hay diferencia en el reconocimiento entre la IgG<sub>1</sub> adsorbida e IgG<sub>1</sub> tratada previamente con un agente desnaturizante como el hidrocloreuro de guanidina [41].

Existen también métodos de inmovilización no específicos pero que involucran la formación de enlaces covalentes para obtener una unión más estable. Para formar este tipo de uniones, generalmente se aprovechan los distintos grupos funcionales de la proteína como el -NH de la lisina, -SH de la cisteína o el -COOH del aspartato/glutamato.

Al igual que los métodos no covalentes, el uso de las técnicas de inmovilización por enlaces covalentes, tienen la ventaja de no necesitar modificaciones en las proteínas ya que se usan los grupos funcionales naturalmente expuestos y por tanto se puede aplicar a cualquier proteína. La desventaja que presentan estos métodos convencionales es que la inmovilización no es orientada lo que genera una población heterogénea en la forma como se exponen las proteínas, además la modificación de los grupos funcionales puede alterar la estabilidad de la proteína ya que las cargas conferidas por grupos amino o carboxilo son importantes en mantener un plegamiento adecuado, e igual que los métodos no-covalentes con matrices con carga o hidrofóbicas, se necesita la proteína previamente purificada para evitar inmovilizar otras contaminantes [40].

## 4.2 Métodos de inmovilización biológicos

Aunque la unión covalente es una de las técnicas de inmovilización más usada, las desventajas descritas, además de la necesidad de técnicas de inmovilización que permitan obtener poblaciones con una orientación homogénea, han hecho que se ponga mayor atención en los métodos basados en reacciones biológicas ya que estos pueden ser altamente selectivos y disminuyen el riesgo de desnaturalización o pérdida de actividad biológica.

Los métodos de inmovilización biológicos han sido utilizados ampliamente como tecnología de purificación [43], pero también se ha investigado su uso en microarreglos [44], en estudios estructurales [45], y de interacción proteína-proteína [46] o proteína-ligando [47]. Estos métodos involucran el uso de proteínas o dominios con afinidad a ligandos específicos, la estrategia general involucra la fusión de una secuencia de ADN que codifica para la etiqueta o dominio de afinidad al gen de interés mediante diferentes técnicas de biología molecular, posteriormente se produce la proteína de fusión con la etiqueta que permite la unión específica a una matriz.

Entre las etiquetas de afinidad más conocidas se encuentra la de histidinas. Consiste en seis residuos secuenciales de histidina que presentan afinidad por iones metálicos divalentes como  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ , siendo este último el más empleado. La interacción es de tipo no covalente y se forma entre el anillo de imidazol de la histidina y el átomo de  $\text{Ni}^{++}$  que a su vez se encuentra acoplado a un soporte. La etiqueta de histidinas puede ubicarse tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal de la proteína y tiene la ventaja de que puede emplearse bajo condiciones desnaturalizantes ya que conserva la capacidad de interactuar con el metal.

Aunque la unión es relativamente específica, la selectividad del método puede verse afectada ya que se ha observado la presencia de proteínas endógenas de *E. coli* que se unen a la resina al competir por los iones metálicos cuando se purifica proteína a través de la etiqueta de histidinas [48, 49], para aumentar la afinidad de las proteínas de fusión se ha probado aumentar la longitud del segmento conteniendo los residuos de histidina o agregar más de una etiqueta de histidinas lo cual suele arrojar mejores resultados [50, 51].

Además del sistema de histidinas, existen otras proteínas que se han utilizado como etiquetas, sin embargo la mayoría de estas estrategias están enfocadas al área de purificación de proteínas lo que requiere tener una unión reversible y por una inmovilización de proteína inestable. Existen algunas alternativas que ofrecen una unión más estable, por ejemplo la interacción no covalente que se da entre la avidina y la biotina, ayudado por el hecho de que ambas proteínas se reportan como estables ante pH extremos, temperatura, agentes desnaturalizantes y proteólisis [40]. La desventaja de este tipo de sistema es que necesita que las proteínas se encuentren previamente marcadas con biotina para poder interactuar con la avidina lo que conduce a una mayor manipulación de las proteínas de interés.

Entre las etiquetas de afinidad que se han empleado, se encuentran aquellas que corresponden a dominios de fijación a carbohidrato para llevar a cabo la inmovilización y purificación de enzimas de interés. Las ventajas que este tipo de

sistemas presentan es que permiten la inmovilización sobre sustratos abundantes y económicos e incluso algunos pueden unirse irreversiblemente a su sustrato [43].

Existe también la posibilidad de usar enzimas fusionadas a la proteína de interés para llevar a cabo la inmovilización. La técnica consiste en emplear un sustrato análogo o inhibidor inmovilizado en un soporte. Dicho ligando es reconocido específicamente por una enzima de “captura” que lleva a cabo una reacción que forma un enlace covalente, a diferencia de las etiquetas de afinidad que al reconocer un ligando forman interacciones de tipo no-covalente. La fusión con la enzima de captura puede ser diseñada tanto en el extremo amino o carboxilo y se puede llevar a cabo la inmovilización en un solo paso a partir del extracto crudo, sin embargo, para que el sistema funcione adecuadamente, el soporte con el ligando acoplado debe ser de reciente preparación y almacenado bajo condiciones controladas para evitar degradación del ligando lo que repercute en el costo del sistema [40, 52].

Tabla 1. Resumen de las diferentes estrategias de inmovilización de proteína.

Métodos Físicoquímicos	Descripción	Ventajas	Desventajas
Inmovilización no-covalente	Inmovilización en superficies con carga o hidrofóbicas	Aplicable a cualquier proteína. Se puede realizar en un solo paso. No se necesitan reactivos para marcar la proteína o capturarla.	Unión débil, reversible. La orientación de la proteína inmovilizada es al azar y puede ocurrir desnaturalización.
Inmovilización covalente	Unión efectuada entre grupos reactivos del soporte y grupos funcionales de la proteína.	Unión covalente. Aplicable a cualquier proteína. Se puede realizar en un solo paso. No se necesitan reactivos para marcar la proteína o capturarla.	La orientación de la proteína inmovilizada es al azar. La reacción puede ser lenta lo que involucra tiempos de inmovilización largos. Los soportes pueden ser lábiles o costosos.
Métodos Biológicos			
Inmovilización no-covalente	La unión es por afinidad de un dominio o proteína de fusión por un ligando en específico.	La etiqueta se puede ubicar tanto en el extremo amino o carboxilo terminal. El reconocimiento es selectivo lo que evita la necesidad de purificar <i>a priori</i> la proteína. La inmovilización es orientada.	La fusión puede alterar la estructura de la proteína de interés. Los soportes suelen tener asociado un alto costo. Para aplicaciones específicas puede ser necesario remover la etiqueta.
Inmovilización covalente	La enzima de fusión reacciona selectivamente con un ligando inmovilizado formando un enlace covalente.	Unión covalente. La enzima se puede ubicar tanto en el extremo amino o carboxilo terminal. El reconocimiento es selectivo lo que evita la necesidad de purificar la proteína <i>a priori</i> . La inmovilización es orientada.	La talla de la fusión suele ser más grande que de las etiquetas lo que implica mayor gasto metabólico. La fusión puede alterar la estructura de la proteína de interés. Los ligandos deben ser recién preparados para evitar degradación.

## 5. Sistemas microparticulados.

Las micropartículas se encuentran entre los sistemas empleados en la captura o inmovilización de fármacos, proteínas y otras moléculas con actividad biológica que puedan tener aplicaciones terapéuticas. En la elaboración de micropartículas se pueden usar tanto polímeros no degradables como biodegradables, aunque las desventajas asociadas a los polímeros no degradables como su difícil eliminación, toxicidad, biodisponibilidad, ha hecho que se ponga más atención a la elaboración de micropartículas con polímeros naturales o biodegradables, entre los que se encuentran el quitosano, celulosa, almidón, albúmina, gelatina, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, entre otros [53].

Las micropartículas se pueden preparar por diversos métodos como solidificación a partir de una emulsión, por evaporación o extracción de solventes, por polimerización a partir de monómeros u oligómeros modificados químicamente, por mencionar algunos ejemplos. Dependiendo el método elegido para preparar las micropartículas se pueden obtener diferentes propiedades en cuanto a tamaño, composición, cantidad de grupos reactivos en la superficie y morfología [54].

La técnica de microencapsulación por evaporación de solvente se usa ampliamente en farmacia para la obtención de sistemas de liberación controlada. De manera general, el proceso consiste en tener el polímero soluble en una fase orgánica que se emulsifica en agua (fase acuosa) conteniendo algún agente surfactante; a continuación, mientras el sistema se somete a agitación se va extrayendo y evaporando el solvente. El polímero que no es soluble en la fase acuosa se agrega y precipita en forma de esferas, el tamaño de las cuales depende de factores como la velocidad de agitación, la presencia de aditivos y el volumen usado. Otros métodos de fabricación de micropartículas son derivados de éste donde se varía es el orden de las fases o bien el uso de solo fases orgánicas y no acuosas [54, 55] (Fig. 8).

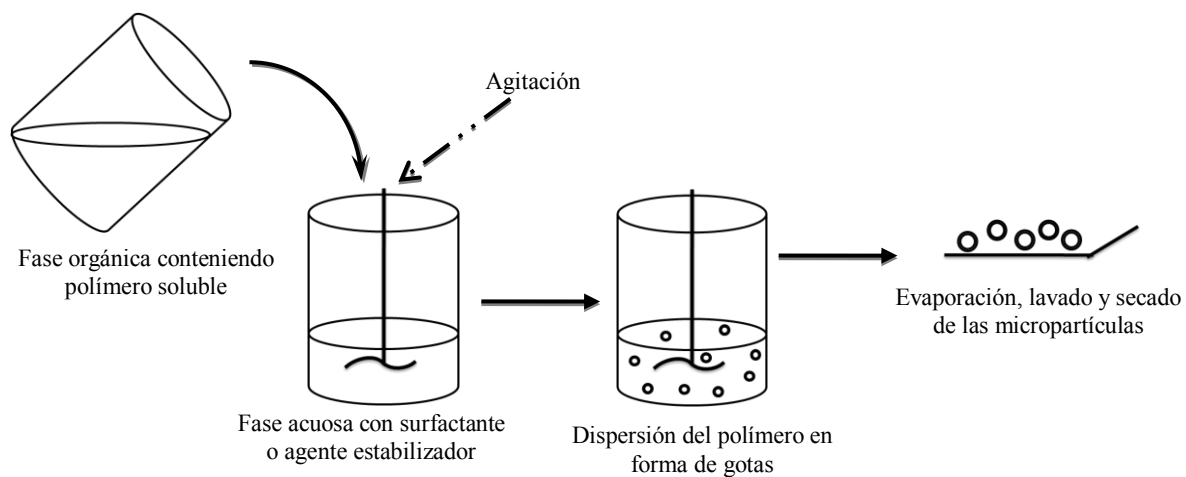


Fig. 8: Esquematización del proceso de manufactura de micropartículas por la técnica de evaporación de solvente en dispersión de agua y solventes (W/O por las siglas en inglés de water-in-oil).

## 5.1 Micropartículas como soporte de proteínas

Las micropartículas son uno de los vehículos más estudiados en la aplicación de proteínas o péptidos con actividad o función de interés tanto a nivel de investigación como industrial. Además de las diferentes estrategias mencionadas para llevar a cabo la inmovilización de las proteínas como la adsorción superficial o las reacciones químicas entre los grupos funcionales de las proteínas y los del sustrato, también se puede llevar a cabo la captura de las proteínas al momento de fabricar las micropartículas de tal manera que quedan embebidas en la matriz polimérica, lo que ayuda a estabilizarlas y protegerlas de la degradación. Sin embargo, debido a que la inmovilización no es orientada puede que no se presente actividad, ya que el dominio o sitio catalítico no se encuentra disponible si no hasta el momento de ser liberadas de la micropartícula [56], como se ha visto con la proteína C y glucosa oxidasa donde es hasta el momento que las micro y nanopartículas de polímeros sintéticos se comienzan a degradar y las proteínas se liberan cuando se detecta la mayor actividad [57, 58].

Para poder llevar a cabo la captura de las proteínas estas se agregan en la fase acuosa y se emulsifican junto con la fase orgánica y el polímero. Cuando el sustrato empieza a polimerizar en forma de microesferas, ya sea por reacciones químicas o al retirar la fase orgánica, la proteína queda atrapada en la matriz polimérica. Este método suele ser apropiado para varias proteínas aunque no se puede describir como un método general, ya que la estabilidad de la proteína depende de su misma naturaleza y de la del polímero [55, 56], por ejemplo, micropartículas con base en ácido poliláctico pueden generar microambientes ácidos que afectan la estabilidad de las proteínas encapsuladas [56, 59] y micropartículas de polietilenglicol-ácido poliláctico copolimerizados presentan una mayor velocidad de degradación [56, 60] y mayor actividad de la enzima capturada que cuando se usan micropartículas elaboradas solo con ácido poliláctico o ácido poliglicólico [57].

La estabilidad de las proteínas durante su inmovilización es un factor importante a tomar en cuenta. Se puede presentar inestabilidad física, que se refiere a la capacidad de la proteína de retener al menos su estructura terciaria y no desnaturalizarse, o bien inestabilidad química que involucra la integridad de la secuencia de aminoácidos y la reactividad de las cadenas laterales que pueden dar lugar a hidrólisis, isomerización, desamidación, oxidación, formación de puentes disulfuro, etc. Los factores que tienen impacto en este tipo de inestabilidades son las interfaces que se forman entre fase acuosa y orgánica y que conducen a la desnaturalización y/o agregación de proteína, además del uso de agentes químicos o solventes [54, 56].

Es en el campo farmacéutico donde las micropartículas han generado más interés como un vehículo de proteínas o péptidos que tengan alguna actividad farmacológica o terapéutica. Existen varias características que hay que tomar en cuenta para tener un eficiente sistema de transporte que permita a las proteínas llegar hasta el sitio donde ejercen su efecto, como la fabricación de la formulación, la forma de liberación, la ruta de administración, además de las características propias de la proteína entre las que se incluye su tamaño molecular, la vida media, inmunogenicidad, estabilidad conformacional, entre otras características bioquímicas [53].

## 5.2 Micropartículas biodegradables para la administración de antígenos vía oral.

Actualmente hay un interés por desarrollar nuevos vehículos de administración por vía oral, esto debido a que la administración oral de antígenos presenta una serie de ventajas de carácter práctico y económico sobre la administración parenteral, ya que no requiere la infraestructura necesaria para las preparaciones inyectables y limita el riesgo de contaminación cruzada por el uso de agujas. Además no requieren asistencia técnica para su administración y evitan el dolor asociado a las inyecciones. Sin embargo, una de las características que se necesita para el desarrollo de este tipo de sistemas es la disponibilidad de vehículos seguros los cuales puedan presentar de manera eficiente los componentes inmunogénicos de un antígeno.

Entre los diversos sistemas que se han probado como vehículos de antígenos se encuentran las sales de alúmina, liposomas, emulsiones, hidrogeles y micropartículas [61]. La eficacia depende no solo de la naturaleza del antígeno sino también del vehículo y su capacidad adyuvante. Las sales de alúmina, junto con la emulsión agua/aceite MF59, AS03 (emulsión agua/aceite +  $\alpha$ -tocoferol) y AS04 (alúmina + lípido A monofosforilado) son adyuvantes aprobados para su uso en humanos [62], siendo las sales de alúmina las más empleadas en todo el mundo por más de 50 años, a pesar de que se les ha relacionado con la inducción de alergias [63, 64]. Otra opción es el uso de microorganismos en administración oral, los cuales han demostrado ser una eficaz herramienta para presentar antígenos de interés, pero uno de los problemas asociados a este tipo de sistemas es el empleo de cepas patógenas que, a pesar de estar atenuadas, puedan presentar efectos nocivos en el organismo, sobre todo para personas con un sistema inmune comprometido [61, 65, 66].

En años recientes, se ha puesto mayor atención al uso de micropartículas con base en polímeros biodegradables como vehículo de antígenos vía oral, ya que la encapsulación o unión de antígenos a sustratos microparticulados mejora su estabilidad durante su paso por el tracto gastrointestinal y aumenta su presentación y reconocimiento por elementos del sistema inmune [61, 67, 68].

A pesar de los beneficios que presenta la vía de administración oral, la más usada para administrar micropartículas sigue siendo la parenteral. No obstante se sigue trabajando en mejorar los resultados obtenidos hasta ahora con micropartículas orales biodegradables, de las cuales se han probado principalmente las de polímeros sintéticos y las de polímeros naturales [53]. Estos últimos son objeto de constante estudio ya que al ser productos de organismos vivos hay mayor disponibilidad de ellos, son más económicos y se les puede realizar un mayor número de modificaciones químicas.

El almidón es un componente común de muchas formulaciones farmacéuticas y es uno de los polímeros naturales que se ha utilizado en la elaboración micropartículas. Se ha utilizado en mezclas con otros polímeros tanto sintéticos como naturales, por ejemplo: quitosano [69], policaprolactona [70] y ácido poliláctico [71], entre otros. Otra

estrategia que se ha empleado en la fabricación de micropartículas de almidón, consiste en el uso de oligosacáridos que poseen grupos reactivos, como maltoligosacáridos con grupos acril, los cuales son utilizados para llevar a cabo la polimerización y formación de la micropartícula. También se puede recubrir la superficie de la microesfera con moléculas como el polidimetilsiloxano que deja libres grupos que pueden unir a la proteína de interés [7, 72, 73].

Con las micropartículas de almidón se han realizado diferentes estudios donde se utilizan como vehículo para la liberación controlada de fármacos [70, 74, 75] o para la administración de antígenos incluyendo la vía oral [75, 76]. En el caso del uso de las micropartículas como vehículo de antígenos se ha demostrado la efectividad de las micropartículas para inducir respuesta inmune hacia los antígenos inmovilizados [6, 75, 76].

No obstante que las micropartículas demostraron su eficacia para presentar a los antígenos vía oral, estos sistemas requieren el uso de oligosacáridos que se encuentran químicamente modificados y solventes, para que se puedan polimerizar las microesferas. Como ya se mencionó, este proceso tiene un costo inherente a la manufactura de las micropartículas además de un costo asociado a la serie de pasos a seguir para eliminar la presencia de residuos de solventes contaminantes.

## **6. Dominios de fijación al almidón en la inmovilización de proteína.**

Al ser el almidón un sustrato microparticulado e insoluble, puede ser utilizado como soporte para la inmovilización de amilasas. Algunos trabajos de los 90's exploraron la capacidad de unión al almidón de algunas amilasas para purificarlas. Por ejemplo, la isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata* y la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus* sp. TS-23 fueron purificadas a partir de sobrenadante utilizando almidón de maíz como soporte, con una eficiencia aproximada del 52% y 53% respectivamente [77, 78].

Cuando se ha empleado a los dominios de fijación al almidón en proteínas de fusión, se ha observado que la capacidad de unión a carbohidrato se mantiene en las proteínas recombinantes [79-81]. Las proteínas se han purificado sobre almidón de maíz, variando las condiciones de elución, ya sea por competencia o bien, cambiando el pH del buffer a condiciones alcalinas (pH 11), en ambos casos la recuperación fue cercana al 50 % de la proteína de fusión [79, 82]. Estos trabajos se reducen a la demostración de la capacidad de las proteínas de fusión de adsorberse al almidón insoluble, uno de ellos propone el uso de estos dominios para la purificación de las proteínas, sin abarcar otras aplicaciones relacionadas con la inmovilización en el gránulo [82].



## JUSTIFICACIÓN

El SBD<sub>tag</sub> y la afinidad que presenta por el almidón pueden ser explotados para facilitar y abaratar los costos asociados a procesos comúnmente realizados en investigación e industria. Como se ha descrito, existen diversas técnicas para llevar a cabo la inmovilización de proteínas. Cada una conlleva diferentes ventajas y desventajas. Los métodos más económicos suelen ser simples y no requieren muchos pasos para llevar a cabo la inmovilización, sin embargo, no son selectivos en cuanto a la orientación de la proteína, puede ocurrir pérdida de actividad biológica y se necesita a la proteína de interés previamente purificada.

Los métodos más selectivos resultan más eficientes, sin embargo suelen ser más costosos debido a la necesidad de realizar alguna modificación a la proteína o en otros casos, debido al alto costo que pueden tener las matrices en las cuales se quiere fijar a las proteínas lo que conlleva la imposibilidad de escalar el método. Con el SBD<sub>tag</sub> se pueden generar proteínas de fusión con una proteína de interés de manera que pueda adsorberse a los gránulos de almidón. Esta adsorción al almidón puede ser orientada y específica, permitiendo que la enzima, proteína o péptido mantenga su actividad biológica, la adsorción se puede llevar a cabo a partir del extracto crudo que contiene a la proteína y si la proteína se puede recuperar de la matriz, no solo se puede utilizar el SBD<sub>tag</sub> para inmovilizar proteína sino también para llevar a cabo su purificación.

Por otra parte, para las aplicaciones del SBD<sub>tag</sub> también se puede utilizar como soporte almidón o análogos de este polímero. La ventaja de usar almidón es que es un sustrato natural que se encuentra de manera abundante y que por tanto resulta muy económico, lo que lo vuelve apto para escalar procesos sin que se tenga un impacto económico importante. Además es ampliamente utilizado como aditivo o excipiente en productos de consumo humano, en este rubro, los gránulos de almidón pueden ser usados como un vehículo para la administración de proteínas con fines terapéuticos o profilácticos al adsorber a su superficie proteínas fusionadas al SBD<sub>tag</sub>.

Al llevar a cabo la inmovilización de proteínas en el gránulo de almidón, se espera tener un efecto protector en la estabilidad de la proteínas en su paso por el tracto gastrointestinal permitiéndoles llegar hasta los sitios blanco, de hecho, se ha observado que la administración de proteínas o antígenos en sustratos microparticulados ayuda a la captura y presentación de los mismos. El uso alternativo del SBD<sub>tag</sub> para adsorber proteínas evitaría los costos asociados con la fabricación de micropartículas y el uso de solventes u otros agentes que afectan la estabilidad de las micropartículas.

## **OBJETIVO**

Desarrollar un sistema de inmovilización de proteínas sobre gránulos de almidón insoluble, utilizando como dominio de afinidad al SBD<sub>tag</sub>.

### **Objetivos Específicos**

Evaluar la capacidad del SBD<sub>tag</sub> para ser utilizado como dominio de afinidad para la purificación de proteínas recombinantes sobre almidón y sus análogos.

Estudiar el potencial del SBD<sub>tag</sub> como un sistema de inmovilización sobre almidón insoluble que permita la utilización de los gránulos como vehículo para la administración oral de antígenos.

## Relevancia de los Módulos de Unión a Carbohidrato

El reconocimiento entre proteína y carbohidrato es una de las interacciones existentes más relevantes para llevar a cabo distintos procesos biológicos. Los carbohidratos existentes en la naturaleza pueden presentar una gran variedad de estructuras, sin embargo las proteínas son capaces de reconocer específicamente los diferentes arreglos existentes. Para ello cuentan con dominios o módulos especializados en la unión a carbohidrato que permiten a los dominios catalíticos modificar o transportar las distintas unidades de azúcares, según sea la función de la enzima.

Con el fin de desarrollar nuevas tecnologías donde se explote el potencial de los CBMs para reconocer específicamente a su sustrato, es necesario primero, tener un entendimiento amplio de sus propiedades así como de los mecanismos que gobiernan la unión a ligando. La adquisición y comprensión de estos conocimientos proporciona no solo un mayor entendimiento a la razón biológica por la cual existen los dominios de unión a carbohidrato sino de las bases para llevar a cabo una manipulación cuidadosa de la interacción entre CBMs y carbohidrato.

En el siguiente artículo se presenta una revisión de los CBMs que abarca desde generalidades como su clasificación y estructuras, hasta el conocimiento reciente que se tiene de ellos en cuanto a su importancia en distintos procesos biológicos en los que se encuentra involucrada la unión entre carbohidrato-CBM.

# Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles

Daniel Guillén · Sergio Sánchez ·  
Romina Rodríguez-Sanoja

Received: 29 August 2009 / Revised: 23 October 2009 / Accepted: 24 October 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Insoluble polysaccharides can be degraded by a set of hydrolytic enzymes formed by catalytic modules appended to one or more non-catalytic carbohydrate-binding modules (CBM). The most recognized function of these auxiliary domains is to bind polysaccharides, bringing the biocatalyst into close and prolonged vicinity with its substrate, allowing carbohydrate hydrolysis. Examples of insoluble polysaccharides recognized by these enzymes include cellulose, chitin,  $\beta$ -glucans, starch, glycogen, inulin, pullulan, and xylan. Based on their amino acid similarity, CBMs are grouped into 55 families that show notable variation in substrate specificity; as a result, their biological functions are miscellaneous. Carbohydrate or polysaccharide recognition by CBMs is an important event for processes related to metabolism, pathogen defense, polysaccharide biosynthesis, virulence, plant development, etc. Understanding of the CBMs properties and mechanisms in ligand binding is of vital significance for the development of new carbohydrate-recognition technologies and provide the basis for fine manipulation of the carbohydrate–CBM interactions.

**Keywords** Carbohydrate-binding domains · Carbohydrate-active proteins · Glucoside hydrolases · Carbohydrate targeting · Expansins · Lectins

D. Guillén · S. Sánchez · R. Rodríguez-Sanoja (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología  
del Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico, Distrito Federal 04510, Mexico  
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

D. Guillén  
e-mail: danielguillenx@yahoo.com.mx

S. Sánchez  
e-mail: sersan@biomedicas.unam.mx

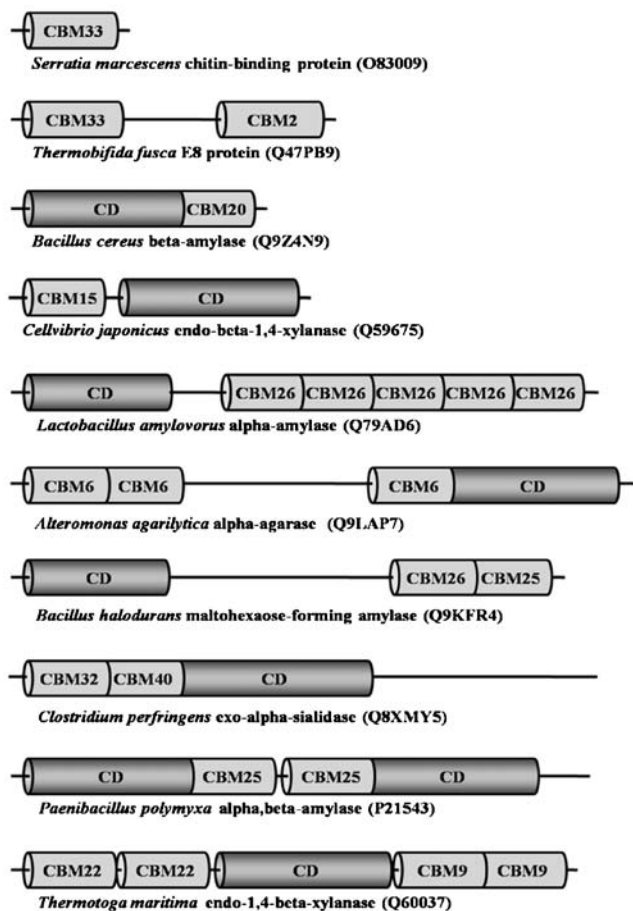
## Introduction

Carbohydrates are biomolecules involved in many life processes such as metabolism, structural support, energy storage, antibiosis, immunological recognition, targeting, attachment, etc. To deal with this multiplicity of functions, several carbohydrate-active proteins have acquired non-catalytic modules that interact very specifically with mono, oligo, and polysaccharides. In general, these carbohydrate-binding modules (CBM) are auxiliary domains with autonomous folding and skilled recognition of the heterogeneous and complex carbohydrate arrangement (Boraston et al. 2004). CBMs may be found in any domain of life, in proteins that recognize polysaccharides such as cellulose, chitin,  $\beta$ -glucans, starch, glycogen, inulin, pullulan, xylan, and many other different sugars such as arabinofuranose, mannan, fucose, lactose, galactose, polygalacturonic acid,  $\beta$ -D-galactosyl-1,4- $\beta$ -D-N-acetylglucosamine, lipopolysaccharides, blood group A/B antigens, etc.

Occasionally, CBMs can also be found isolated, as a single protein, like in the small olive pollen protein Ole e 10 (Barral et al. 2005), the non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2005a) and the proteins E7 and E8 from *Thermobifida fusca* (Felix et al. 2008). However, in carbohydrate-active enzymes (CAZymes) like glycoside hydrolases or glycosyl transferases, CBMs can be localized at the N- or C-terminal end of these proteins (Abe et al. 2004; Juge et al. 2002), between two catalytic modules like in the *Paenibacillus polymyxa* alpha, beta-amylase (Kawazu et al. 1987), as a single unit or arranged in tandem. Such domains may be identical among them or very homologous, as in lactobacilli alpha-amylases (Giraud and Cuny 1997; Morlon-Guyot et al. 2001); but in some cases, tandem CBMs can include modules with different substrate specificity. For instance, the *Clostridium*

*perfringens* exo- $\alpha$ -sialidase contains two CBMs, one that binds galactose or *N*-acetylgalactosamine, and another that specifically binds sialic acid (Boraston et al. 2007). Another example is the *Paenibacillus* sp. xylanase 5 flanked by two CBMs, one at the C-terminus from family 22 and a family 9 CBM at the N-terminus. The family 22 CBM binds xylan, whereas the family 9 CBM binds cellulose (Ito et al. 2003; Fig. 1).

Invariably, the main role of CBMs is to recognize and bind specifically to carbohydrates. The biological consequences of this event result in different functions, such as enhanced hydrolysis of insoluble substrates, bringing the catalytic domain in close proximity to the substrate, polysaccharide structure disruption, and cell surface protein anchoring among other functions attributed to CBMs. This review focuses on the biological importance of CBM–ligand interactions, passing through the basis of modern classification to finally recognize the function of these versatile proteins.



**Fig. 1** CBM distribution in different proteins. They can be present in different numbers and diverse locations in the polypeptide chain. CD symbolizes the position of the catalytic domains in various glycoside hydrolases. The codes in parenthesis correspond to UniProt entries

## Classification and binding

CBMs have been classified based on amino acid similarity. In the latest update of the CAZY database (July 21st, 2009), 8,730 CBMs were grouped into 55 families, the most abundant family being number 48, with 2,000 entries, all the characterized members bind glycogen (<http://www.cazy.org>). The information in this database is continuously updated and reanalyzed in such a way that new families are frequently added (Cantarel et al. 2009).

In the CAZY database, structures for 40 of the 55 families have been reported and, from its analysis, it is clear that while CBMs vary widely in their carbohydrate specificities, common folds are observed in proteins with different specificities and belonging to different taxonomic groups.

The most important conformational element of most CBMs is the beta-sheet. The folds and architecture displayed by these beta-sheets have been classified into seven families (Boraston et al. 2004; Hashimoto 2006) with the  $\beta$ -sandwich being the most recurrent fold (Table 1). The topology of CBM–ligand binding sites, which is related to the class of ligand they recognize, has also been used as a criterion to classify them into three different “types” (Boraston et al. 2004). Type A CBMs have a flat or platform-like hydrophobic surface composed of aromatic residues. The planar conformation of the type A binding site interacts with the flat surfaces of crystalline polysaccharides such as cellulose or chitin. In contrast, the binding site architecture of type B CBMs, which bind amorphous cellulose or xylan, displays a cleft arrangement in which aromatic residues interact with free single polysaccharide chains. Aromatic side chains are oriented in such a way that forms twisted or sandwich platforms. Type B CBMs also recognize substrates like beta-1,3-glucans, mixed beta-(1,3)(1,4)-glucans, beta-1,4-mannan, glucomannan, and galactomannan. The last are the Type C

**Table 1** CBMs classification based on fold (updated from Boraston et al. 2004 and Hashimoto 2006)

Fold family	Fold	CBM families
1	$\beta$ -sandwich	2, 3, 4, 6, 9, 11, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 51
2	$\beta$ -trefoil	13, 42
3	cystein knot	1
4	unique	5, 12
5	OB fold	10
6	hevein fold	18
7	Unique (hevein-like fold)	14

or lectin-like CBMs that only bind mono-, di-, or trisaccharides due to steric restriction in the binding site.

The residues involved in the binding sites have been identified using NMR, site-directed mutagenesis and structural data (Goto et al. 1994; Itoh et al. 2006; Newstead et al. 2005; Pantoom et al. 2008; Rodríguez-Sanoja et al. 2009; Simpson et al. 2000; Sorimachi et al. 1997; Viegas et al. 2008). In general, the importance of aromatic amino acids, especially tryptophan, but also the highly conserved tyrosine residues, is well known. They form stacking interactions with the sugar rings resulting in strong van der Waals interactions, thus stabilizing the structure. In addition, the side chain of other polar amino acid residues may form hydrogen bonds with the sugar ligand, helping to stabilize the interaction. Several studies suggest that orientation of aromatic residues is responsible for the different ligand specificities of the CBM families.

In summary, efficient binding and recognition of polysaccharides is directed by the appropriate topology that mirrors the substrate structure and the orientation of conserved residues situated in the binding sites of the CBMs. This arrangement allows interaction with a specific ligand from the sugar units of the polysaccharide backbone or with the sugar units branched to the polysaccharide backbone (Miyanaga et al. 2006; Najmudin et al. 2006). Subtle changes in the topology of binding sites dictate ligand specificity and explain why CBMs with apparent similar structure recognize different ligands.

### CBM in carbohydrate-active enzymes

Most organisms produce CAZymes to perform diverse modifications to carbohydrates, such as cleavage or formation of glycosidic bonds in di-, oligo-, or polysaccharides and glycoconjugates (Cantarel et al. 2009), either to obtain simple sugars from polysaccharides or for assembling, like in remodeling plant cell walls. Among CAZymes, glycoside hydrolases (GH) and glycosyl transferases (GT) are the enzymes with the most members.

The hydrolysis of an insoluble polysaccharide such as cellulose, starch, etc., requires GH (in soluble phase) to approach and anchor to polysaccharide chains. The CBM function in these proteins is to increase the effective enzyme concentration on the polysaccharide surface (Bolam et al. 1998), enhancing enzymatic activity. Removal of the CBM leads to a reduction, and in some cases, abolition of binding to insoluble substrates, resulting in a partial or complete loss in catalytic activity. However, the activity on soluble substrates is not frequently affected (Jörg and Wolfgang 2006; Waeonukul et al. 2009).

Thus, for efficient polysaccharide hydrolysis, the interaction between CBMs and their substrates must be a dynamic

process where the catalytic domain (CD) is first positioned in proximity to the substrate through the CBM and then the CD is able to hydrolyze the polysaccharide chains situated in the active site. A reasonable second step is the CBM relocation to new regions on the substrate in such a way that continuous hydrolysis takes place. Conversely, for some CBMs, such as cellulose-binding domains (CBD), irreversible binding has been reported (McLean et al. 2002; Yi-Heng Percival and Lee 2004), however, biologically, an event like irreversible binding to cellulose seems wasteful and detrimental to enzymatic activity because once the substrate has been hydrolyzed, the enzyme is incapable of being relocated somewhere else within the substrate.

In order to determine whether CBDs permit displacement from one site to another in the cellulose substrate, a family 2 CBM from *Acidothermus cellulolyticus* was labeled with quantum dots and bound to cellulose crystals. The results showed directional movement of the CBM along the cellulose crystal (Liu et al. 2009), which is in agreement with previous work where surface diffusion of exoglycanase CBD was demonstrated (Jervis et al. 1997). Alternatively, although the binding of CBM2a from xylanase 10A of *Cellulomonas fimi* to BMCC appears to be irreversible, surface exchange between CBM2a free in solution and bound to BMCC has been demonstrated, suggesting a mechanism by which the active enzyme takes the place of the inactive enzyme on the surface of the substrate (McLean et al. 2002).

In addition, the plant cell wall is not only made of cellulose, it is accompanied by many other polysaccharides, such as hemicelluloses and pectins, with the backbone decorated with different sugar molecules (Cosgrove 2005). Consequently, microorganisms that degrade plant material produce a set of GHs with different activities such as xylanases, cellulases, endotransglucosylases, etc., CBMs of these enzymes often reflect the specificity of the contiguous catalytic domain (at least for Type B and C CBMs; Michel et al. 2009). The relevance of a congruent catalytic domain CBM specificity is that CBMs allow specific targeting of the GH to the polysaccharide substructures within the dense plant cell wall (McLean et al. 2002). These are then susceptible to hydrolytic attack by the catalytic domain to which CBMs are appended.

In vitro studies using purified substrates, such as bacterial microcrystalline cellulose (BMCC) and phosphoric-acid-swollen cellulose, have previously shown that CBMs identify fine substructures in cellulose samples (Boraston et al. 2003; McLean et al. 2002). Recent studies developed in situ, using CBMs from six different families (all of them with affinity for purified xylan), demonstrated that although they showed similar specificity for the purified substrate, they target plant cells differentially, with variations in xylan specificity in both primary and secondary plant cell walls (McCartney et al.

2006). A similar study was conducted with eight CBDs, four of them were Type A CBMs with affinity for crystalline cellulose, three were Type B with affinity for amorphous cellulose and one was Type C with affinity for reducing ends of cellulose chains. Type A and Type B CBMs showed certain degree of difference between recognition of secondary and primary plant cell walls, while both types display specificity variations within their own groups confirming plant- and tissue-specific identification (Blake et al. 2006). A biological reason for the existence of the diversity of CBMs with the same polysaccharide specificity but multiplicity in recognition, could be the heterogeneous structure of cell wall polysaccharides and the ligand accessibility depending on cell type, tissue, and botanic origin, hence the diversity in CBMs mirrors the diversity in nature's polysaccharide arrangement.

As mentioned above, CBMs also are present in GTs, which catalyzes the transfer of sugar moieties from activated donor molecules to specific acceptors, such as another sugar, proteins, or lipid molecules, forming glycosidic bonds. Studies on GT CBMs are not as numerous as those on GH CBMs. However, it is known that they also play a key role in these enzymes, for example, starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*, an enzyme involved in plant starch biosynthesis, possesses three repeated starch-binding domains (CBM53) in the N-terminal end that not only bind the enzyme to starch but also play a regulatory role in its catalytic activity as demonstrated by an increase in the apparent enzyme affinity for glycogen (Valdez et al. 2008). Recently, CBMs from family 45 (Mikkelsen et al. 2006) and family 20 (Christiansen et al. 2009) from two glucan, water dikinases have been reported. These CBMs have a weak affinity for starch, but to date, the biological relevance of this phenomenon has not been determined.

Another example of the importance of CBMs in GTs is given by UDP-GalNAc:polypeptide  $\alpha$ -*N*-acetylgalactosaminyltransferases, enzymes that start mucin-type *O*-glycosylation. These enzymes have a lectin domain that corresponds to family 13 CBMs, which is necessary for the transfer of *N*-acetyl-D-galactosamine residues to glycopeptides and also determines the site of glycosylation for glycopeptide substrates. The mechanism suggested for lectin domain modulation at the glycosylation site is that it aids substrate binding directly and possibly enhances product release (Raman et al. 2008). Thus, CBMs not only recognize and attach the enzymes to their substrate but can also regulate their catalytic properties.

### Substrate disruption by CBMs

Among the functions proposed for CBMs, substrate disruption has been a controversial topic, nevertheless

information proving this function for some CBMs is convincing (Shoseyov et al. 2006). Binding of CBMs to a crystalline substrate leads to polysaccharide chains disorganization and enhancement of substrate availability. Evidence for this substrate disruption, is given by the independent and non-catalytic chitin-binding protein CBP21, which belongs to CBM family 33 and is produced by *S. marcescens*. CBP21 promotes efficient crystalline chitin degradation by chitinases through polar interactions that modify the substrate arrangement (Vaaje-Kolstad et al. 2005b). The E8 protein from *T. fusca* that contains a family 33 CBM, a fibronectin domain (FNIII) and a family 2 CBM, also showed significant increase in chitinase activity over  $\beta$ -chitin when added in conjunction with chitinase C from *S. marcescens* (Felix et al. 2008).

CBMs also show non-hydrolytic disruption activity on other substrates such as starch (Southall et al. 1999) and cellulose fibers (Din et al. 1991). On starch, the amylose chains suffer conformational changes upon attachment of the starch-binding domain (SBD) of *Aspergillus niger* glucoamylase. This SBD has two binding sites that, upon interaction with the amylose, induce a loop formation of the amylose chains. Although each site has affinity and is capable of binding amylose, both sites are necessary to induce the conformational change (Giardina et al. 2001). Using the CBD of cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum* on cellulose and scanning the reaction by electron microscopy, it was demonstrated that binding of the CBD to cotton fibers leads to structural changes and release of short fibers (Gao et al. 2001). The suggested mechanism implicated in CBD substrate disruption involves modification of the hydrogen bond network in cellulose. A recent study with the CBD of cellobiohydrolase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 supports this mechanism. This work illustrates that binding of the CBD to cotton fibers promotes severe weakening of the cellulose-interchain hydrogen bonds (Wang et al. 2008).

An enzyme located next to CBMs, which possess disruption functions may have facilitated hydrolysis of recalcitrant substrates, giving it an advantage over other enzymes. This idea is supported by experimental evidence that CBMs have disruption functions, although this property does not seem to be shared by many CBMs. Further research will provide more information about this particular feature.

Another interesting attribute of CBMs is the role that they could play in development and modulation of plant cell walls. For example, the olive pollen protein Ole e 10, which has been recently classified as a family 43 CBM, is an independent CBM that binds to callose (1,3- $\beta$ -glucan, a major component of the pollen tube wall), suggesting a role in regulation of the enzymatic activity of proteins implicated into cell wall synthesis and degradation during pollen germination (Barral et al. 2005).

An additional class of proteins involved in plant cell wall modulation, are the expansins, which have loosening and enlargement effects on plant cell walls during plant growth, and are thought to function in plant cell wall disassembly, pollen germination, and pollen tube penetration (Cosgrove 2005; Shoseyov et al. 2006). Expansins have two domains, an N-terminal domain with structural and sequence similarities to the catalytic domain of endoglucanases from family GH45 and a C-terminal domain, related to a family of grass pollen allergens, which has a putative CBM function with cellulose-binding ability (Shoseyov et al. 2006) and possible disruption of wall polysaccharides (Cosgrove 2005). Despite the similarity to endoglucanases, this enzymatic activity has not been detected in expansins (Cosgrove 2005).

On the other hand, a search of structural similarity revealed significant resemblance between CBM3 of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* and the allergens from *Phleum pratense* Phl p1 ( $\beta$ -expansin) and Phl p2 (expansin-like protein). 3D structures of CBM3 and Phl p2 displayed close similarity along the protein backbone and specific amino acid groups positions (Shoseyov et al. 2006). This data suggest the idea that in some expansins the C-terminal domain is indeed a CBM, more specifically a CBD. However, to corroborate this hypothesis, future structural studies and biochemical characterization of these domains is necessary.

Along the same line, a swollenin protein from *Trichoderma asperellum* constituted by an N-terminal cellulose-binding domain, classified in family CBM-1 and a C-terminal expansin-like domain was reported. This protein enhances *Trichoderma* plant root colonization through a suggested mechanism in which there is swelling of the plant cell wall and where the presence of the CBD is indispensable for protein full activity (Brotman et al. 2008). Expansins are also present among other plant pathogens, such as the parasitic roundworm *Globodera rostochiensis*. This nematode expansin with a family 2 CBD has corroborated plant cell wall weakening activity. It has been suggested that the simultaneous secretion of plant cell wall degrading enzymes and expansins with cell wall loosening activity, assists in the hydrolysis of plant cell wall polysaccharides enhancing the penetration of cyst nematodes into the host plant (Qin et al. 2004).

Isolated CBMs have the property of modulating the plant cell wall arrangement in a similar manner as expansins do. Evidence for this was obtained using heterologous expression in *Nicotiana tabacum* of two tandem family 29 CBMs derived from a non-catalytic protein of the cellulase/hemicellulase complex of *Piromyces equi* (Obembe et al. 2007). The CBM29 of *P. equi* is a Type B CBM with affinity for a range of ligands that include xylan, galactomannan, glucomannan, and hydroxyethylcellulose (Flint et

al. 2005) and is also capable of binding to different tissues of the wild-type tobacco stem. The results of tandem CBM29 expression in the recombinant tobacco plant were a reduced stem elongation rate, enlarged xylem and collapsed cortical cells. These modifications to the plant cell wall structure support the idea that CBMs can modulate plant cell wall loosening and development (Obembe et al. 2007).

Data collected to date suggest a close functional resemblance between CBMs and the putative polysaccharide-binding domains from expansins. Indeed, a recent crystal structure determination of a canonical expansin from *Bacillus subtilis* reveals a C-terminal domain similar to Type A CBMs (Kerff et al. 2008; Fig. 2), which suggest that expansins have polysaccharide-binding domains not yet classified as CBMs.

This information illustrates that CBMs can be involved in the mechanisms of microorganism colonization and invasion (Brotman et al. 2008; Kerff et al. 2008; Qin et al. 2004), but CBMs are also capable of eliciting a defensive response in the plant host. When the CBD of the swollenin from *Trichoderma* was injected in cucumber leaves and incubated with seedlings, induction of local defense gene was observed 24 h after injection in leaves and roots. The CBD was also capable of affording plant protection against bacterial and fungal pathogens (Brotman et al. 2008). Another example involves the cellulose-binding elicitor lectin (CBEL) from *Phytophthora parasitica*, a protein with two CBDs classified in the CBM 1 family that enables *Phytophthora* adhesion to cellulose. In the tobacco plant, CBEL induces defense responses, where the presence of the CBDs and the aromatic residues involved in cellulose-binding are sufficient and fundamental for full elicitor activity. This probably occurs through interaction with the plant cellulose microfibrils, where polysaccharide disruption is perceived as a warning signal (Dumas et al. 2008; Gaulin et al. 2006).

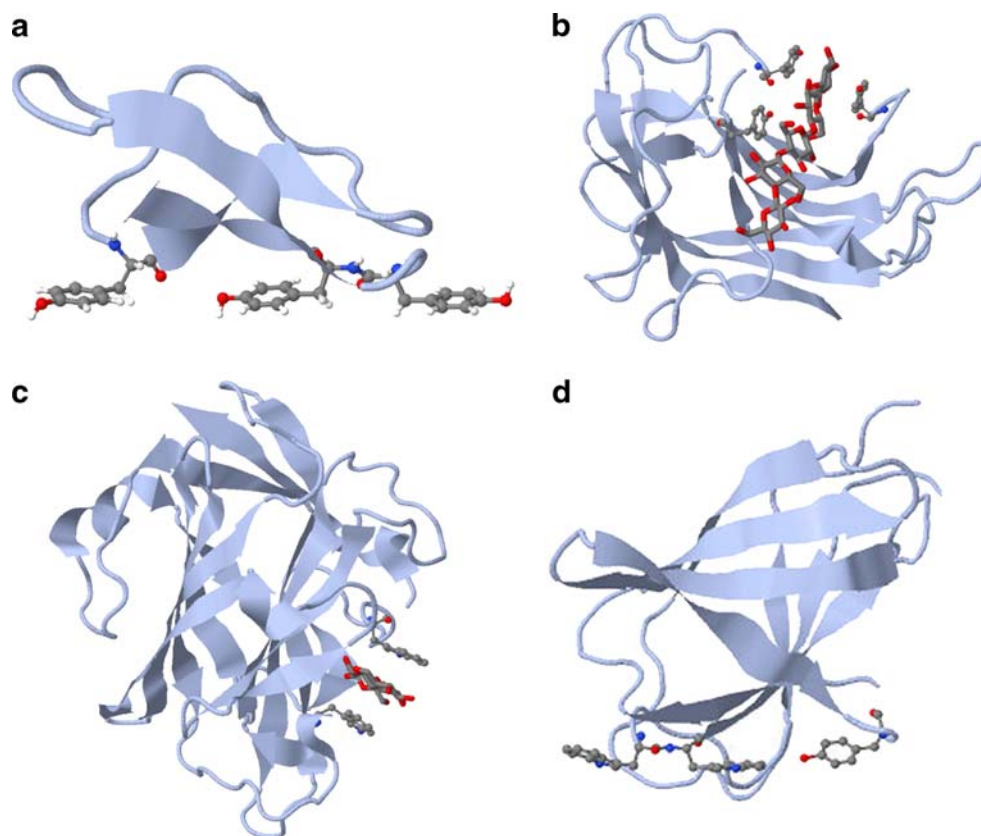
These findings place the mentioned CBDs as a novel class of pathogen-associated molecular patterns (Dumas et al. 2008) with the added function of eliciting plant defense responses upon attachment to cellulose. Whether this biological role can be encountered in CBMs with other polysaccharide specificities, for example chitin, remains to be elucidated.

### CBM in pathogenic bacteria

In addition to plant cell wall polysaccharide binding, CBMs can also recognize glycans in animal cells in the form of glycoproteins, glycolipids, or other glycoconjugates. In recent years, the existence of CBMs in virulence factors or in proteins related to metabolism in pathogens has been reported (Abbott et al. 2007; Gregg et al. 2008; Xu et al.



**Fig. 2** CBM Structures from different sources. **a** Type A CBM from *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I (PDB code 1CBH; Kraulis et al. 1987), **b** Type B CBM from *C. fimi* endo-1,4-glucanase C (PDB code 1GU3; Boraston et al. 2002), **c** Type C CBM from *Thermotoga maritime* xylanase 10A (PDB code 1I82; Notenboom et al. 2001), **d** D2 Domain with structural features similar to type A CBM from *B. subtilis* expansin-like protein (PDB code 3D30; Kerff et al. 2008). Aromatic residues are in ball–stick representation and carbohydrates in stick representation



2008). These proteins, together with toxins and hydrolases secreted by pathogens, could promote tissue destruction and enhance either bacterial spread or pathogenesis (Anderson et al. 2005; Boraston et al. 2007; Ficko-Blean and Boraston 2006). Recognized glycans include Lewis<sup>Y</sup> antigen (Boraston et al. 2006), sialic acid (Moustafa et al. 2004), blood group A/B antigens, and galactose-configured residues (Gregg et al. 2008; Table 2).

Studies with virulence factors from *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* provide evidence of host tissue recognition by multivalent binding of pullulanases with tandem CBM41 to alveolar type II cells from mouse lung. The suggested biological function of these CBMs is to bind *Streptococcus* to the reserves of intracellular glycogen in

alveolar cells allowing polysaccharide degradation by the pathogen (van Bueren et al. 2007). A similar enhanced affinity to host lung tissue was shown with a virulence factor containing three family 47 CBMs from *S. pneumoniae* with specificity for fucosylated carbohydrates. The virulence factor was capable of binding ABH blood group antigens and more efficiently binding to Lewis<sup>Y</sup> antigen (Boraston et al. 2006).

In *C. perfringens*, binding to AB blood group antigens has also been reported for a family 51 CBM (Gregg et al. 2008), which is appended to a catalytic domain that cleaves the AB antigen trisaccharide (Anderson et al. 2005). Noticeably, a CBM51, also from *C. perfringens* but contained in a fucosidase, displayed affinity for galactose-configured sugars. Structural overlapping showed lack of

**Table 2** CBMs present in toxins, virulence factors or pathogenesis associated proteins

Microorganism	Protein	Family	CBM arrangement	References
<i>S. pneumoniae</i>	Fucolectin-related protein	CBM47	Three tandem in C-terminus	(Boraston et al. 2006)
	Pullulanase	CBM41	Two tandem in N-terminus	(van Bueren et al. 2007)
	Neuraminidase B	CBM40	Single N-terminus	(Gut et al. 2008)
<i>S. pyogenes</i>	Pullulanase	CBM41	Two tandem in N-terminus	(van Bueren et al. 2007)
<i>V. cholerae</i>	Sialidase	CBM40	Single N-terminus	(Moustafa et al. 2004)
<i>C. perfringens</i>	μ-toxin	CBM32	Four tandem in the middle	(Ficko-Blean and Boraston 2009)
	Sialidase	CBM32,CBM40	N-terminal tandem with one of each family	(Boraston et al. 2007)

conserved functional residues, conversely, amino acid sequence identity analysis, revealed putative clustering into subfamilies, where CBM51a is AB blood-group-antigen-specific and CBM51b is galactose-specific (Gregg et al. 2008).

A sialidase in *Vibrio cholerae* has a lectin-like domain classified as a family 40 CBM (Moustafa et al. 2004). This domain recognizes sialic acid and serves to increase the catalytic efficiency of the sialidase to a greater extent in polyvalent substrates than in monovalent substrates (Thobhani et al. 2003). *C. perfringens* secretes a multimodular sialidase (NanJ) with a family 32 CBM followed by a family 40 CBM in the N-terminus. The CBM32 binds *N*-acetylgalactosamine and galactose while the CBM40 recognizes sialic acid. Their tandem arrangement probably functions to enhance the affinity for glycoconjugates that contain their respective ligands. It is also suggested that additional modules present in NanJ could be implicated in protein–protein interactions, thus other enzymes could require NanJ in order to remain adhered to the glycoconjugate even after sialic acid cleavage (Boraston et al. 2007).

The significance of understanding the mechanism and specificity of ligand recognition in CBMs situated in virulence factors is related to the possibility of designing new compounds that target the biological function of CBM–ligand binding as a way to control pathogenesis or dissemination of pathogenic bacteria.

### Other CBM-associated functions

CBMs may have other functions. For instance, in a recent work, the binding properties of three family 37 CBMs from *Ruminococcus albus* were analyzed. The data obtained revealed that CBM37, which binds to cellulose, is also capable of binding to the surface of *R. albus* (Ezer et al. 2008). Furthermore, the function of four family 35 CBMs, appended to a glucosaminidase (CsxA) from *Amycolatopsis orientalis*, and to three plant cell wall hydrolases (a rhamnogalacturonan acetyl esterase (Cthe\_3141) from *C. thermocellum*, a pectate lyase (Pel10) from an environmental isolate and the xylanase CjXyn10B from *Cellvibrio japonicus*), were recently analyzed. The four CBMs share high similarity, and are able to bind  $\Delta$ 4,5-anhydrogalacturonic acid, a signature molecule for plant cell wall degradation. Nevertheless, the CBM35 of CsxA anchors the enzyme to the bacterial surface. Hence, the suggested biological role for the CBM35s of plant cell wall hydrolases is to target the appended enzymes to zones of plant degradation that are more susceptible to enzymatic attack, instead of targeting the bacterial surface (Montanier et al. 2009).

Finally, *Yersinia enterocolitica* produces a protein that corresponds to an isolated family 32 CBM that has binding

site architecture distinct from other structurally characterized family 32 CBMs. This protein possesses the ability of binding polymerized galacturonic acid ligands. The gene corresponding to this CBM is located within a pectin utilization operon; therefore, it has been proposed that *Y. enterocolitica* CBM32 is involved in the processing of pectin-derived carbohydrates. In the suggested model, CBM32 binds to polygalacturonic acid in the periplasm and prevents diffusion of the ligand back to extracellular space (Abbott et al. 2007).

### Concluding remarks

As reflected by the presented data, the carbohydrate–protein interaction is essential for many biological processes. In the recognition of carbohydrates, CBMs play a key role, since the property of binding to these molecules has been exploited in such a different ways by living organisms. The conserved structures and mechanisms of carbohydrate-binding modules between species are related to shared functions in different organisms and are a sign of the efficient ligand recognition and binding function in these proteins. The role of CBMs is more than polysaccharide binding and promotion of efficient substrate hydrolysis, even though this is the most widespread and common function; CBMs are also important in events related with metabolism, pathogen defense, polysaccharide biosynthesis, virulence, plant development, etc.

Comprehension of the CBMs properties and mechanisms in ligand binding will provide a strong platform for development of new carbohydrate-recognition technologies and will give us the basis for fine manipulation of carbohydrate–ligand interactions. Each day, the knowledge in the field of CBMs grows, as is reflected in the continuous expansion of the CBM families. Future research will provide us with new structures and families of CBMs and, therefore, a more detailed understanding of the biological rationale for CBMs and their associated functions.

**Acknowledgments** We are indebted to Elizabeth Langley for language correction and to Beatriz Ruiz and Silvia Moreno for critical reading of the manuscript. Daniel Guillén is currently supported by a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

### References

- Abbott DW, Hrynuik S, Boraston AB (2007) Identification and characterization of a novel periplasmic polygalacturonic acid binding protein from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol* 367:1023–1033
- Abe A, Tonzuka T, Sakano Y, Kamitori S (2004) Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase I with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *J Mol Biol* 335:811–822

- Anderson KM, Ashida H, Maskos K, Dell A, Li S-C, Li Y-T (2005) A clostridial endo-beta-galactosidase that cleaves both blood group A and B glycotopes: the first member of a new glycoside hydrolase family, GH98. *J Biol Chem* 280:7720–7728
- Barral P, Suárez C, Batanero E, Alfonso C, Alché JD, Rodríguez-García MI, Villalba M, Rivas G, Rodríguez R (2005) An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem J* 390:77–84
- Blake AW, McCartney L, Flint JE, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J Biol Chem* 281:29321–29329
- Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP, Gilbert HJ (1998) *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J* 331:775–781
- Boraston AB, Nurizzo D, Notenboom V, Ducros V, Rose DR, Kilburn DG, Davies GJ (2002) Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related beta-1, 4 and beta-1, 3 glucan-binding modules. *J Mol Biol* 319:1143–1156
- Boraston AB, Kwan E, Chiu P, Warren RAJ, Kilburn DG (2003) Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J Biol Chem* 278:6120–6127
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382:769–781
- Boraston AB, Wang D, Burke RD (2006) Blood group antigen recognition by a *Streptococcus pneumoniae* virulence factor. *J Biol Chem* 281:35263–35271
- Boraston AB, Ficko-Blean E, Healey M (2007) Carbohydrate recognition by a large sialidase toxin from *Clostridium perfringens*. *Biochemistry* 46:11352–11360
- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008) Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147:779–789
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:233–238
- Christiansen C, Hachem MA, Glaring MA, Vikso-Nielsen A, Sigurskjold BW, Svensson B, Blennow A (2009) A CBM20 low-affinity starch-binding domain from glucan, water dikinase. *FEBS Lett* 583:1159–1163
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861
- Din N, Gilkes NR, Tekant B Jr, RCM WRAJ, Kilburn DG (1991) Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technol* 9:1096–1099
- Dumas B, Bottin A, Gaulin E, Esquerré-Tugayé M-T (2008) Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners? *Trends Plant Sci* 13:160–164
- Ezer A, Matalon E, Jindou S, Borovok I, Atamna N, Yu Z, Morrison M, Bayer EA, Lamed R (2008) Cell surface enzyme attachment is mediated by family 37 carbohydrate-binding modules, unique to *Ruminococcus albus*. *J Bacteriol* 190:8220–8222
- Felix M, Diana I, Shaolin C, David BW (2008) Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnol Bioeng* 100:1066–1077
- Ficko-Blean E, Boraston AB (2006) The interaction of a carbohydrate-binding module from a *Clostridium perfringens* N-acetyl-beta-hexosaminidase with its carbohydrate receptor. *J Biol Chem* 281:37748–37757
- Ficko-Blean E, Boraston AB (2009) N-acetylglucosamine recognition by a family 32 carbohydrate-binding module from *Clostridium perfringens* NagH. *J Mol Biol* 390:208–220
- Flint J, Bolam DN, Nurizzo D, Taylor EJ, Williamson MP, Walters C, Davies GJ, Gilbert HJ (2005) Probing the mechanism of ligand recognition in family 29 carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem* 280:23718–23726
- Gao P-J, Chen G-J, Wang T-H, Zhang Y-S, Liu J (2001) Non-hydrolytic disruption of crystalline structure of cellulose by cellulose binding domain and linker sequence of cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum*. *Acta Biochim Biophys Sin* 33:13–18
- Gaulin E, Drame N, Lafitte C, Torto-Alalibo T, Martinez Y, Ameline-Torregrosa C, Khatib M, Mazarguil H, Villalba-Mateos F, Kamoun S, Mazars C, Dumas B, Bottin A, Esquerré-Tugayé M-T, Rickauer M (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell* 18:1766–1777
- Giardina T, Gunning AP, Juge N, Faulds CB, Furniss CSM, Svensson B, Morris VJ, Williamson G (2001) Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose. *J Mol Biol* 313:1149
- Giraud E, Cuny G (1997) Molecular characterization of the alpha-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
- Goto M, Semimaru T, Furukawa K, Hayashida S (1994) Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 60:3926–3930
- Gregg KJ, Finn R, Abbott DW, Boraston AB (2008) Divergent modes of glycan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem* 283:12604–12613
- Gut H, King SJ, Walsh MA (2008) Structural and functional studies of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase B: an intramolecular trans-sialidase. *FEBS Lett* 582:3348–3352
- Hashimoto H (2006) Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cell Mol Life Sci* 63:2954–2967
- Ito Y, Tomita T, Roy N, Nakano A, Sugawara-Tomita N, Watanabe S, Okai N, Abe N, Kamio Y (2003) Cloning, expression, and cell surface localization of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 5, a multidomain xylanase. *Appl Environ Microbiol* 69:6969–6978
- Itoh Y, Watanabe J, Fukada H, Mizuno R, Kezuka Y, Nonaka T, Watanabe T (2006) Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1176–1184
- Jervis EJ, Haynes CA, Kilburn DG (1997) Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem* 272:24016–24023
- Jörg K, Wolfgang L (2006) Comparative characterization of deletion derivatives of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima*. *Extremophiles* 10:373–381
- Juge N, Gal-Coeffet ML, Furniss C, Gunning A, Kramhoft B, Morris VJ, Williamson G, Svensson B (2002) The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis. *Biologia Bratislav* 57:239–245
- Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N, Sasaki T, Yamagata H, Tsukagoshi N, Udaka S (1987) Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for enzymatically active fragments of the *Bacillus polymyxa* beta-amylase. *J Bacteriol* 169:1564–1570
- Kerff F, Amoroso A, Herman R, Sauvage E, Petrella S, Filee P, Charlier P, Joris B, Tabuchi A, Nikolaidis N, Cosgrove DJ (2008) Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16876–16881

- Kraulis J, Clore G, Nilges MJ, TA PG, Knowles J, Gronenborn A (1987) Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* 28:7241–7257
- Liu Y-S, Zeng Y, Luo Y, Xu Q, Himmel ME, Smith SJ, Ding S-Y (2009) Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface? *Cellulose* 16:587–597
- McCartney L, Blake AW, Flint J, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP (2006) Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4765–4770
- McLean BW, Boraston AB, Brouwer D, Sanaie N, Fyfe CA, Warren RAJ, Kilburn DG, Haynes CA (2002) Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *J Biol Chem* 277:50245–50254
- Michel G, Barbeyron T, Kloreg B, Czjzek M (2009) The family 6 carbohydrate-binding modules have coevolved with their appended catalytic modules toward similar substrate specificity. *Glycobiology* 19:615–623
- Mikkelsen R, Suszkiewicz K, Blennow A (2006) A novel type carbohydrate-binding module identified in  $\alpha$ -glucan, water dikinases is specific for regulated plastidial starch metabolism. *Biochemistry* 45:4674–4682
- Miyahara A, Koseki T, Miwa Y, Mese Y, Nakamura S, Kuno A, Hirabayashi J, Matsuzawa H, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S (2006) The family 42 carbohydrate-binding module of family 54  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicellulose. *Biochem J* 399:503–511
- Montanier C, van Bueren AL, Dumon C, Flint JE, Correia MA, Prates JA, Firbank SJ, Lewis RJ, Grondin GG, Ghinet MG, Gloster TM, Herve C, Knox JP, Talbot BG, Turkenburg JP, Kerovuo J, Brzezinski R, Fontes CMGA, Davies GJ, Boraston AB, Gilbert HJ (2009) Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3065–3070
- Morlon-Guyot J, Mucciolo-Roux F, Rodríguez Sanoja R, Guyot JP (2001) Characterization of the *Lactobacillus manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. *DNA Seq* 12:27–37
- Moustafa I, Connaris H, Taylor M, Zaitsev V, Wilson JC, Kiefel MJ, von Itzstein M, Taylor G (2004) Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *J Biol Chem* 279:40819–40826
- Najmudin S, Guerreiro CIPD, Carvalho AL, Prates JAM, Correia MAS, Alves VD, Ferreira LMA, Romão MJ, Gilbert HJ, Bolam DN, Fontes CMGA (2006) Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with beta-glucan chains. *J Biol Chem* 281:8815–8828
- Newstead SL, Watson JN, Bennet AJ, Taylor G (2005) Galactose recognition by the carbohydrate-binding module of a bacterial sialidase. *Acta Cryst* 61:1483–1491
- Notenboom V, Boraston AB, Kilburn DG, Rose DR (2001) Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry* 40:6248–6256
- Obembe O, Jacobsen E, Timmers J, Gilbert H, Blake A, Knox J, Visser R, Vincken J-P (2007) Promiscuous, non-catalytic, tandem carbohydrate-binding modules modulate the cell-wall structure and development of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *J Plant Res* 120:605–617
- Pantoom S, Songsiriritthigul C, Suginta W (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC Biochem* 9:2
- Qin L, Kudla U, Roze EHA, Goverse A, Popeijus H, Nieuwland J, Overmars H, Jones JT, Schots A, Smant G, Bakker J, Helder J (2004) Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature* 427:30
- Raman J, Fritz TA, Gerken TA, Jamison O, Live D, Liu M, Tabak LA (2008) The catalytic and lectin domains of UDP-GalNAc:Polypeptide  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase function in concert to direct glycosylation site selection. *J Biol Chem* 283:22942–22951
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sanchez S (2009) A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:341–346
- Shoseyov O, Shani Z, Levy I (2006) Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:283–295
- Simpson PJ, Xie H, Bolam DN, Gilbert HJ, Williamson MP (2000) The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem* 275:41137–41142
- Sorimachi K, Gal-Coëffet M-FL, Williamson G, Archer DB, Williamson MP (1997) Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to  $\beta$ -cyclodextrin. *Structure* 5:647–661
- Southall SM, Simpson PJ, Gilbert HJ, Williamson G, Williamson MP (1999) The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett* 447:58–60
- Thobhani S, Ember B, Siriwardena A, Boons G-J (2003) Multivalency and the mode of action of bacterial sialidases. *J Am Chem Soc* 125:7154–7155
- Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH (2005a) The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* 280:28492–28497
- Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AHK, Eijsink VGH, van Aalten DMF (2005b) Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J Biol Chem* 280:11313–11319
- Valdez HA, Busi MV, Wayllace NZ, Parisi G, Ugalde RA, Gomez-Casati DF (2008) Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47:3026–3032
- van Bueren AL, Higgins M, Wang D, Burke RD, Boraston AB (2007) Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat Struct Mol Biol* 14:76–84
- Viegas A, Brás NF, Cerqueira NMFS, Fernandes PA, Prates JAM, Fontes CMGA, Bruix M, Romão MJ, Carvalho AL, Ramos MJ, Macedo AL, Cabrita EJ (2008) Molecular determinants of ligand specificity in family 11 carbohydrate binding modules, an NMR, X-ray crystallography and computational chemistry approach. *FEBS J* 275:2524–2535
- Waeonukul R, Pason P, Kyu KL, Sakka K, Kosugi A, Mori Y, Ratanakhanokchai K (2009) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a multidomain endo-beta-1, 4-xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and characterization of the recombinant enzyme. *J Microbiol Biotechnol* 19:277–285
- Wang L, Zhang Y, Gao P (2008) A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China C Life Sci* 51:620–629
- Xu G, Potter JA, Russell RJM, Oggioni MR, Andrew PW, Taylor GL (2008) Crystal structure of the NanB sialidase from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 384:436–449
- Yi-Heng Percival Z, Lee RL (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 88:797–824

## El SBD<sub>tag</sub> como Etiqueta de Afinidad para la Purificación de Proteínas Recombinantes

La producción de proteínas recombinantes tanto en investigación como a nivel industrial es un proceso comúnmente realizado que implica obtener grandes cantidades de proteína con un grado de pureza que puede variar según el uso que se le quiera dar. Existen diversos sistemas que se emplean para llevar a cabo la purificación de las proteínas, entre ellos se encuentran las etiquetas de afinidad, las cuales se fusionan a las proteínas de interés para que estas puedan unirse específicamente a un soporte o ligando inmovilizado y así ser selectivamente separadas de una mezcla compleja.

Lo soportes o resinas de afinidad son generalmente costosas y por tanto no aptas para llevar a cabo procesos de escalamiento. Con la incorporación del SBD<sub>tag</sub> en proteínas de fusión como una etiqueta de afinidad, se pretende demostrar la viabilidad del sistema para realizar la purificación de proteínas de diferentes fuentes usando como soporte almidón o análogos del almidón. Los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento y costo se comparan con uno de los sistemas más usados como lo es la etiqueta de histidinas que tiene afinidad por resina niquelada, que es un soporte catalogado como “económico”.

# The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification

D. Guillén · S. Moreno-Mendieta · P. Aguilera ·  
S. Sánchez · A. Farres · R. Rodríguez-Sanoja

Received: 28 December 2012 / Revised: 13 February 2013 / Accepted: 14 February 2013 / Published online: 16 March 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Recombinant protein purification with affinity tags is a widely employed technique. One of the most common tags used for protein purification is the histidine tag (His<sub>tag</sub>). In this work, we use a tandem starch-binding domain (SBD<sub>tag</sub>) as a tag for protein purification. Four proteins from different sources were fused to the SBD<sub>tag</sub>, and the resulting fusion proteins were purified by affinity chromatography using the His<sub>tag</sub> or the SBD<sub>tag</sub>. The results showed that the SBD<sub>tag</sub> is superior to the His<sub>tag</sub> for protein purification. The efficient adsorption of the fusion proteins to raw corn starch was also demonstrated, and two fusions were selected to test purification directly using raw starch from rice, corn, potato, and barley. The two fusion proteins were successfully recovered from crude bacterial extract using raw starch, thus demonstrating that the SBD<sub>tag</sub> can be used as an efficient affinity tag for recombinant protein purification on an inexpensive matrix.

**Keywords** Starch-binding domain · Purification tag · Affinity tag · Fusion protein · Protein immobilization

## Introduction

One of the major tasks in science and industry is the production of good quality proteins in large quantities for different purposes. Affinity tags are the most common and popular tools used for recombinant protein purification. These tags can be either proteins or short amino acid sequences that confer binding specificity generally to small ligands or another protein, such as an antibody, usually immobilized on a solid support.

The selection of an appropriate affinity tag depends on the intrinsic characteristics and the desired application of the protein of interest. In general, the use of tags for protein purification offers a series of advantages, including enrichment on purification by hundred-fold from crude extracts, the enhanced solubility of expressed protein, minimal effects on the tertiary structure, and biological activity of the fusion protein and applicability to a number of different proteins (Arnau et al. 2006). A list of common affinity tags including matrices and cost is provided in Table 1.

Affinity resins are generally expensive and consequently are not useful for large-scale protein purification. Tags such as the cellulose-binding domain and the chitin-binding domain use polysaccharides that are abundantly present in nature as purification matrices, which could permit the development of low-cost systems for recombinant protein purification (Liao et al. 2012; Wan et al. 2011; Terpe 2003). Both systems are currently used in commercial expression vectors, pET CBD vectors (Novagen) and Impact Kit vectors (NEB).

Another carbohydrate-binding domain with remarkable characteristics as a purification tag is the starch-binding domain (SBD). This domain is usually present in enzymes with starch-modifying activities, in which it promotes

---

D. Guillén · S. Moreno-Mendieta · P. Aguilera · S. Sánchez ·  
R. Rodríguez-Sanoja (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México, México, Distrito Federal 04510, México  
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

D. Guillén  
Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

S. Moreno-Mendieta  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

A. Farres  
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de  
Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

**Table 1** Affinity tags employed in fusion protein purification and their general use conditions

Tag	Size (aa)	Affinity Matrix	Elution	Cost (USD/mLg)	Supplier
His-tag	6–10	Ni <sup>2+</sup> -NTA	Imidazole, low pH	5,496/500 mL	SIGMA
Glutathione S-transferase	201	GST-sepharose	Reduced glutathione	1,251/50 mL	SIGMA
Streptag II	8	Strep-Tactin-Sepharose	Desthiobiotin	15,924/1,000 mL	IBA
Maltose binding protein	396	Amylose	Maltose	661/1,000 mL	NEB
FLAG	8	mAb-Matrix	EDTA, Flag peptide	612/mL	SIGMA
c-myc	11	mAb-Matrix	Low pH, c-myc peptide	561/mL	SIGMA
Calmodulin binding peptide	26	Calmodulin	EGTA	671/10 mL	SIGMA
Chitin-binding domain	51	Chitin	Thiol induced self cleavage	288/100 mL	NEB
Cellulose-binding domain	107–158	Cellulose	Ethylene glycol, low ionic strength	336/1,000 g	SIGMA

attachment to the substrate and increases substrate concentration at the active site of the enzyme (Rodríguez-Sanoja et al. 2005a). The SBD could be used in fusion protein technology as a tag for purification or immobilization on raw starch, starch derivatives, or starch analogs. In addition, the natural availability of starch and its chemical properties, e.g., that it is naturally particulate, inert, and approved for pharmaceutical and human uses, makes it an attractive, low-cost matrix for biotechnological procedures.

In this work, we used a tandem starch-binding domain as a tag for fusion protein purification (SBD<sub>tag</sub>). We generated four recombinant proteins using green fluorescent protein (GFP),  $\alpha$ -crystalline from *Mycobacterium tuberculosis* (Acr), tetanus toxin fragment C (Tc) and *Entamoeba histolytica* Cys-rich protein (CR) fused to the SBD<sub>tag</sub>. We then, developed a protein purification system to isolate the fusion proteins using affinity chromatography with an immobilized starch analog. Furthermore, raw starches from different sources were tested as purification matrices, and the feasibility of the system in comparison with the popular His<sub>tag</sub> system was analyzed.

## Materials and methods

### Microbial strains and media

*Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  [*supE44 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17*] was used as cloning host, and *E. coli* strain BL-21(DE3) [*F<sup>-</sup>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 (lacI lacUV5-T7gene1ind1 sam7 nin5))*] was used for protein production. All strains were grown in LB medium (1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, and 1 % NaCl) supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL) when necessary for plasmid maintenance.

### Construction of plasmids

All DNA manipulations were performed using standard protocols (Sambrook et al. 1989). To construct the fusion

proteins, the green fluorescent protein (*gfp*; from *Renilla reniformis* GB DJ381359.1),  $\alpha$ -crystalline protein (*acr*; from *M. tuberculosis* GBM76712), tetanus toxin fragment C (*tc*; from *Clostridium tetani* GBM12739), and cysteine-rich protein (*cr*; from *E. histolytica* GB XM644379) genes were amplified by polymerase chain reaction to add *Bam*HI sites to each gene.

Templates for amplifications were as follows: for *gfp*, pIRES-hrGFP-1 (Stratagene); for *acr*, pCR4 Topo-Acr (kindly donated by Dr. Espitia, C—not published); for *cr* gene, pED-CREHP (donated by Dr. Carrero, JC) (Carrero 1998), and for *tc*, pBR327+FragBC+COOH (donated by M.S. Munguía, ME) (Osuna 1989). The amplified fragments were purified from a 1 % agarose gel, ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions, and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroporation (Sambrook et al. 1989).

The obtained pGEM-T-easy constructs were digested with *Bam*HI, and the released fragments were purified and ligated to the *Bam*HI-digested pQE31-SBD<sub>tag</sub>. The vector pQE31-SBD<sub>tag</sub> is derived from vector pQE31 (QIAGEN), which carries a sequence encoding a His<sub>tag</sub> that allows the identification and purification of the fusion protein using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and a tandem of SBD for purification by affinity chromatography to starch. The gene fusions were verified by sequencing (Laragen, Inc.).

### Gene expression

Constructs were electrotransformed into *E. coli* BL21(DE3) for protein expression. The strains were grown in LB medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL) and 1 % glycerol in the specific case of AcrSBD expression. Cells were grown for 12 h at 29 °C (O.D.<sub>600</sub>  $\approx$  0.5–0.6). Protein expression was induced by the addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside to a final concentration of 0.1 mM, and the incubation was continued at 29 °C for 3–8 h. Cells were harvested (8,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C) and washed in

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH7.4 before lysis. The obtained proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) and identified by Western blotting with a primary anti-His antibody (Roche) and a secondary anti-mouse immunoglobulin G antibody labeled with alkaline phosphatase (Perkin-Elmer Life Sciences), according to the manufacturer's instructions.

#### Protein purification using the His<sub>tag</sub>

For fusion protein purification, the *E. coli* pellet was resuspended to 1/100 of the original culture volume of a buffer containing 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM imidazole, and 1 % Triton X-100 at pH7.4, with protease cocktail inhibitor (SIGMA). Cells were disrupted by sonication, and the collected supernatant (15,000 rpm for 30 min at 4 °C) was filtered through a 0.22 μm pore membrane. The fusion proteins were purified through affinity adsorption on immobilized metal affinity chromatography (HisTrap<sup>TM</sup> HP column) using an AKTA Prime system (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocols.

#### Protein purification using SBD<sub>tag</sub>

The *E. coli* pellet was resuspended to 1/100 of the original culture volume in a buffer containing 25 mM citrate-phosphate, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, and 1 % Triton X-100 at pH7.0, including protease cocktail inhibitor (SIGMA) and 20 mM maltose. The cells were disrupted as described for the His<sub>tag</sub> purification above. Proteins were purified using an AKTA Prime system (GE Healthcare) by affinity chromatography to a β-cyclodextrin-epoxy-activated Sepharose 6B column (16×35 mm), as previously described (Vretblad 1974). After exhaustive washes with 25 mM citrate-phosphate buffer, pH7.0, the bound protein was eluted with 8 mM β-cyclodextrin in the same buffer at a flow rate of 1 mL/min for 40 min.

#### Binding assay

Before the binding assays, the proteins were extensively dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer, pH7.0, and protein purity was assessed by SDS-PAGE (Laemmli 1970). Various amounts of protein were added to a prewashed raw corn starch suspension (final concentration, 1 %) in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH7.0, to a final volume of 60 μL. As a control, equal number of samples, without starch, were prepared to determine the protein concentration after treatment. The samples with and without starch were incubated at 4 °C for 30 min with gentle shaking (10 rpm) and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. To calculate the total amount of protein bound, the protein

concentration in the supernatant of the samples with starch (unbound protein) was subtracted from the total protein in the supernatant of the samples without starch (Belshaw and Williamson 1990).

The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm with the theoretical molar extinction coefficient (ε) obtained with the software ProtParam (ExpASy). The ε values used were as follows: GFPSBD<sub>tag</sub>, 125,725 L/molcm; for AcrSBD<sub>tag</sub>, 104,170 L/molcm; for CRSBD<sub>tag</sub>, 129,610 L/molcm; and TcSBD<sub>tag</sub>, 192,410 L/molcm. The binding parameters (*K*<sub>ad</sub> [in milliliters per milligram of starch]) were calculated from the slopes obtained from the linear adsorption curve constructed using at least 10 initial concentrations of purified enzyme (GraphPad Prism 4).

#### Purification using raw starch

Two fusion proteins, CRSBD<sub>tag</sub> and TcSBD<sub>tag</sub>, were used to test the suitability of raw starch matrices for purification. Suspensions of corn starch, rice starch, potato starch (SIGMA), and barley starch (Olvera et al. 2012) were prepared by washing three times with cold water and once with 25 mM citrate-phosphate buffer, pH7.0 (binding buffer); after which, the starch was resuspended in the same buffer.

*E. coli* extracts were obtained as described above for purification with the SBD<sub>tag</sub>, and 10 mg of barley, potato, rice, or corn starch were added. The mixture was incubated at 4 °C for 2 h with gentle shaking (10 rpm) and centrifuged at 5,000 rpm for 3 min. The starch pellet was washed four times with 10 volumes of binding buffer, and the fusion protein was then eluted with two washes of 1/2 volume of 8 mM β-cyclodextrin in the same buffer. Proteins were analyzed by SDS-PAGE (Laemmli 1970).

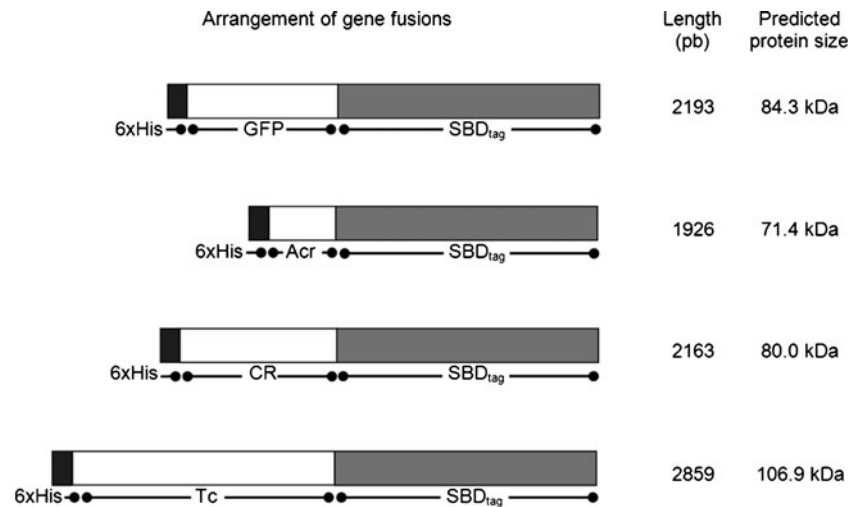
#### Fusion protein quantification

ELISA assays were developed according to the manufacturer's instructions (QIAGEN) with slight modifications to obtain a more precise measurement of the concentration of the fusion protein in bacterial extracts and recovered eluates. Briefly, a curve with serial concentrations of purified fusion protein was elaborated and used to coat 96-well microplates in 50 mM carbonate buffer, pH9.6. Serial dilutions of *E. coli* extract and eluate samples were added to the plate in the same buffer and incubated overnight at 4 °C. The plate was then washed three times with PBS-0.05 % Tween. This wash was repeated after blocking and antibody incubation. Nonspecific binding to the plate was minimized by blocking the wells with 3 % skim milk (DIFCO) in PBS-Tween at 37 °C for 30 min.

The coated plate was then incubated 2 h at 37 °C with anti-His antibody diluted 1:1,000 (GeneTex). Then, the plate



**Fig. 1** Schematic representation of the fusion constructs. The SBD<sub>tag</sub> is located at the C-terminus of recombinant proteins and the His-tag at the N-terminus



was washed and incubated for 2 h at 37 °C with goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase diluted 1:1,000 (Invitrogen). After washing, the developing solution (SIGMA FAST OPD tablets, SIGMA) was added to the plates and incubated for 30 min at room temperature. Plates were read at 450 nm in a Multiskan FC (Thermo Scientific). The concentrations of unknown samples were interpolated based on the optical density values obtained from the standard curve.

## Results

### Construction and production of fusion proteins

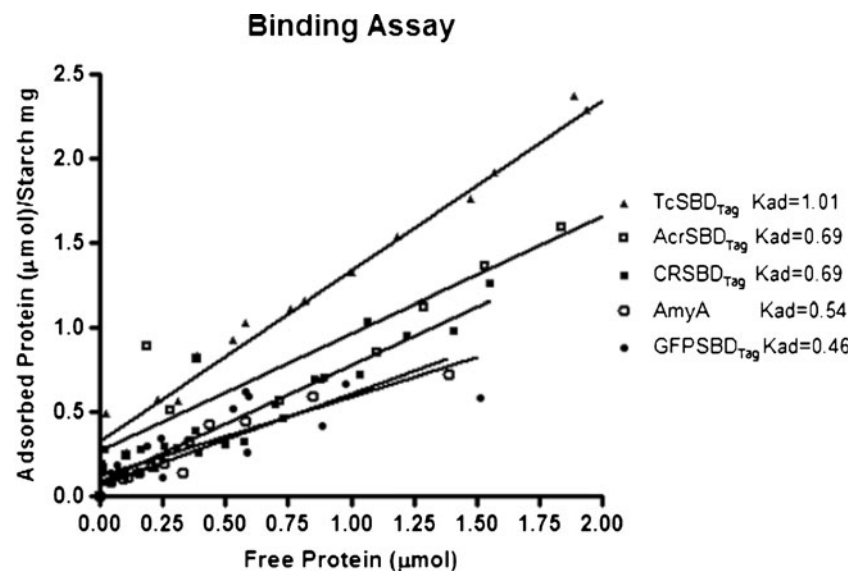
Four proteins from different sources were selected to test the efficiency of the SBD<sub>tag</sub> vs the His<sub>tag</sub>. To compare the purification capability of each tag, dual affinity tagged

versions of each protein were constructed, rendering the construct 6xHis-Protein-SBD<sub>tag</sub>. The encoded proteins were named GFPSBD<sub>tag</sub>, AcrSBD<sub>tag</sub>, CRSBD<sub>tag</sub>, and TcSBD<sub>tag</sub>; each one has different molecular weight (80–107 KDa) (Fig. 1), all of them were produced in the soluble phase and worked under native conditions.

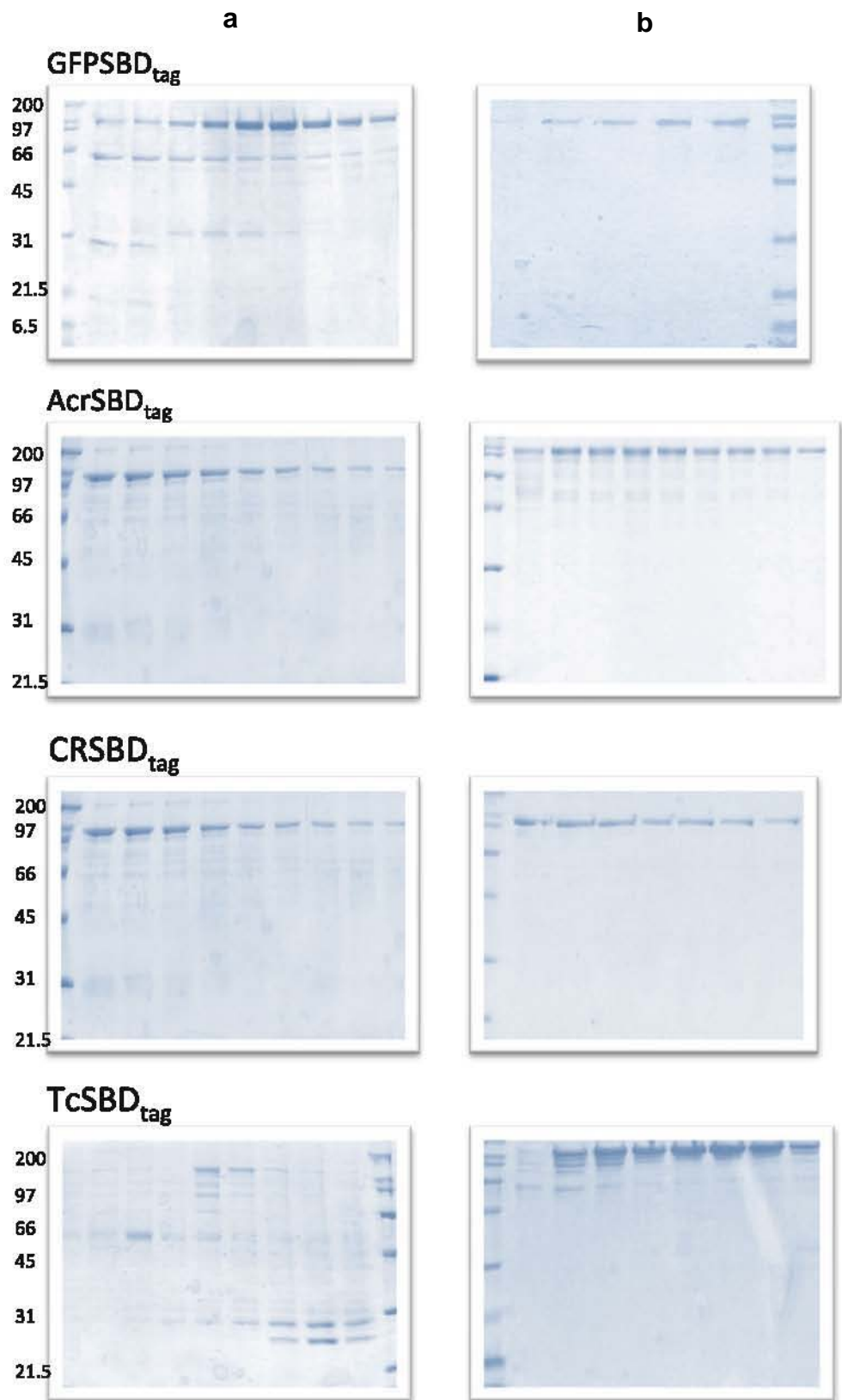
### Adsorption assay

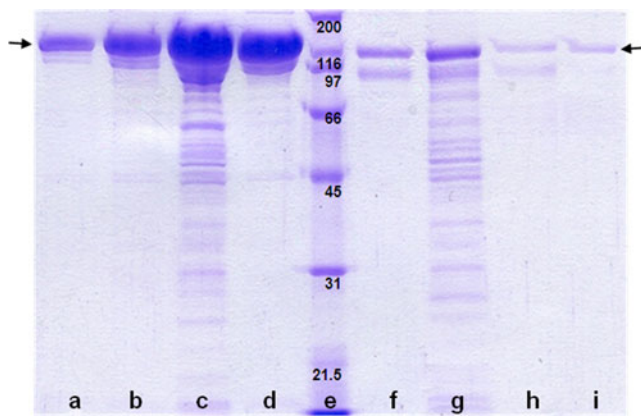
The affinity of the fusion proteins for corn starch was compared to that of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase (Rodríguez-Sanoja et al. 2005b). Figure 2 shows the obtained adsorption isotherms for each fusion. The linear adsorption isotherms indicate the apparent equilibrium between the protein present in the solid phase (bound protein) and the protein in the soluble phase (unbound protein) at different protein concentrations. Adsorption constants ( $K_{ad}$ ) were calculated from the slopes obtained from the linear

**Fig. 2** Adsorption isotherms for fusion proteins and wild type amylase (*AmyA*) considering free protein (unbound) after equilibrium. The  $K_{ad}$  describes the partitioning of the protein between the solid and liquid phases at low surface coverage



**Fig. 3** Purification of the fusion proteins, indicated with *arrows*. **a** Proteins eluted from a His<sub>6</sub> tag/Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity column. **b** Proteins eluted from a β-cyclodextrin affinity column





**Fig. 4** Fusion protein elution from raw starch, indicated with *arrow*. **a** TcSBD<sub>tag</sub> from barley starch, **b** TcSBD<sub>tag</sub> from potato starch, **c** TcSBD<sub>tag</sub> from rice starch, **d** TcSBD<sub>tag</sub> from corn starch, **e** Molecular weight marker (Broad-Range Bio-Rad), **f** CRSBD<sub>tag</sub> from corn starch, **g** CRSBD<sub>tag</sub> from rice starch, **h** CRSBD<sub>tag</sub> from potato starch, and **i** CRSBD<sub>tag</sub> from barley starch

adsorption using at least 10 initial concentrations of purified enzyme (Chen et al. 1995).

#### Purification by affinity chromatography

The two tested tags employ different modes of interaction with the affinity resin, but both can be eluted from the resin by competition. The histidine tag is one of the most widely used tags for recombinant protein purification (Structural Genomics Consortium 2008). The purification principle is based on the affinity that short histidine sequences present for transition metal ions ( $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ , and  $\text{Cu}^{++}$ ) immobilized in a solid support.

A sepharose column containing complexed  $\beta$ -cyclodextrin was prepared for protein purification using the SBD<sub>tag</sub> as an affinity tag.  $\beta$ -cyclodextrin is a cyclic molecule composed of seven glucoses that mimics the structure of amylose, a helical polysaccharide that is present in the starch granule. The SBD<sub>tag</sub> has capacity to bind immobilized  $\beta$ -cyclodextrin; in this way, the fusion proteins were purified from the *E. coli* extracts. Maltose was added to decrease the possible

**Table 3** Cost comparison based on the quantity of support needed to obtain 1 mg of fusion protein

Protein	Support	Cost (USD)	\$/protein mg
TcDFA	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	\$5,496/0.5 L	12.1
	Corn Starch	\$74/5Kg	<0.0001
	Rice Starch	\$62/Kg	<0.0005
	Potato Starch	\$90/Kg	<0.0005
CRDFA	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	\$5,496/0.5 L	11.32
	Corn Starch	\$74/5Kg	<0.0005
	Rice Starch	\$62/Kg	<0.001
	Potato Starch	\$90/Kg	<0.001

nonspecific binding of contaminant proteins. The eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the His<sub>tag</sub> purification and the SBD<sub>tag</sub> purification were compared (Fig. 3). In all cases, the purification was better when using the SBD as affinity tag.

#### Purification using raw starch

To test the convenience of using starch as a purification matrix, two fusion proteins (TcSBD<sub>tag</sub> and CRSBD<sub>tag</sub>) were purified by adding starch from different sources, including corn, rice, potato, and barley, to the *E. coli* extracts containing the fusion proteins. The eluted fusion protein (Fig. 4) was quantified, and the results were compared with those of the affinity chromatography purification (Table 2).

All the starches tested were able to retain the fusion proteins from the crude bacterial extract for their posterior elution with a yield at least of 70 %. TcSBD<sub>tag</sub> was recovered well using three starches (corn, rice, and potato), while the best results for CRSBD<sub>tag</sub> were obtained with corn and rice. These results are in concordance with the data obtained from the adsorption assays, which showed that TcSBD<sub>tag</sub> was better adsorbed to the starch granule than was CRSBD<sub>tag</sub>.

For both fusion proteins, barley starch showed the lowest recovery rates but also the fewest co-purifying bands. Conversely, rice starch presented a good recovery rate (above 85 %) but also more unwanted bands than the other

**Table 2** The recovery rates of fusion proteins purified by  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (His<sub>tag</sub>),  $\beta$ -cyclodextrin (SBD<sub>tag</sub>) affinity chromatography or using raw starch from different sources

	% Protein Recovery					
	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	$\beta$ -cyclodextrin	Corn Starch	Rice Starch	Potato Starch	Barley Starch
TcSBD <sub>tag</sub>	28±7.3 %	90.7±1.8 %	95.5±4.5	86.6±1.7	90.8±5.7	73.7±2.4
CRSBD <sub>tag</sub>	81±5.8 %	86.1±4.9 %	99.5±4.4	99.0±3.3	77.2±1.6	70.1±1.0

The recovery rate is defined as (eluted fusion protein/total fusion protein in *E. coli* lysates)×100. Numbers are the average of two independent experiments

starches. The better compromise between yield and purity was obtained with raw corn starch.

## Discussion

Granular starch adsorption assays showed that the starch-binding capacity was conferred to all proteins fused to the SBD<sub>tag</sub> (Fig. 2). The comparison of the isotherms and the  $K_{ad}$  values obtained for the fusions with those of  $\alpha$ -amylase indicates that the adsorption of the different fusion proteins to the starch granule is as effective as the adsorption of  $\alpha$ -amylase, except for the TcSBD<sub>tag</sub> fusion, which exhibited even stronger adsorption to the starch granule. Although the reason for this phenomenon is not clear, it is possible that an unspecific TcSBD<sub>tag</sub>–carbohydrate interaction takes place; likely due to the reported affinity of tetanus toxin fragment C for carbohydrates such as galactose or lactose (Emsley et al. 2000).

The comparison of the His<sub>tag</sub> and SBD<sub>tag</sub> purifications is shown in Fig. 3. The degree of purification was higher for the SBD<sub>tag</sub> fusion proteins than for the fusions purified through the His<sub>tag</sub> in all cases. Among the SBD<sub>tag</sub> fusions, the best purified protein was CRSBD<sub>tag</sub>, while AcrSBD<sub>tag</sub> was the protein that presented the most co-eluting bands. In the case of His<sub>tag</sub> fusions, the best results were observed with CRSBD<sub>tag</sub>, while TcSBD<sub>tag</sub> presented the most co-purified bands. In this particular case, the fusion protein could not be acceptably purified, regardless of the different IMAC conditions used (e.g., buffer imidazole concentration or flow rate). It is possible that the His<sub>tag</sub> is not well exposed in TcSBD<sub>tag</sub> and thus could not interact with the metal ions in the resin. A second explanation is that the size of TcSBD<sub>tag</sub> affects the binding of the tag to the resin. In that case, a larger poly-histidine sequence could facilitate the fusion protein purification since purification efficiency can be dependent on His<sub>tag</sub> length (Terpe 2003), as well as the inherent properties of the target protein.

In contrast with the His<sub>tag</sub> system, TcSBD<sub>tag</sub> was successfully purified using the  $\beta$ -cyclodextrin/SBD<sub>tag</sub> affinity system. Western blot analysis of co-purified bands revealed that they are different size products of the TcSBD<sub>tag</sub> protein (data not shown).

To exploit the carbohydrate affinity conferred by the SBD<sub>tag</sub>, the fusion proteins were subjected to purification via raw starch. Starch is a glucose polysaccharide that is usually found as insoluble granules and is highly abundant in nature. For this reason, compared with available commercial resins, starch represents an inexpensive matrix for fusion protein purification.

Starches from four different sources, barley, corn, potato, and rice, were tested as purification matrices. The starches from barley, corn, and potato were able to retain the fusion

proteins, allowing extensive washing and good elution yields. The selected fusion proteins (TcSBD<sub>tag</sub> and CRSBD<sub>tag</sub>) were well separated from a complex protein mixture, i.e., *E. coli* lysate (Fig. 4). In the specific case of rice starch, the fusion proteins were also adsorbed but eluted with unwanted contaminant proteins. This phenomenon could be related to the nature and minor size of the rice starch granule ( $\cong 4 \mu\text{m}$ ), which tends to form a condensed pellet that is more difficult to disperse in solution and therefore to wash, while barley ( $\cong 27 \mu\text{m}$ ) and potato (up to  $100 \mu\text{m}$ ) starches have a larger granule size and are more easily dispersed in solution.

Of all the systems tested, the best protein recovery with the least contamination was obtained with the  $\beta$ -cyclodextrin column, which allowed  $\geq 90\%$  recovery of the two fusion proteins. Similar results were obtained with raw starch, with efficiencies from 70 to 99% (Table 2). A previous study had tested a fusion between the GFP and a SBD from *Rhizopus oryzae*. The authors reported that 45–55% of protein was recovered from corn starch when it is added directly to the protein solution (Lin et al. 2009). The use of a tandem SBD system clearly improves protein recovery (70–99.5%) (Guillen et al. 2007).

The His<sub>tag</sub> is one of the most commonly employed tags for recombinant protein purification and has been successfully used for the purification of many proteins, although some proteins can only be partially purified with this tag (Lichty et al. 2005). For all the fusion proteins tested here, purification with the SBD<sub>tag</sub> was always more effective than purification with the His tag at three levels, the degree of protein recovery, the minimal presence of co-purified proteins, and also in the purification costs associated with each support. Table 3 shows the purification cost for 1 mg of fusion protein depending on the chosen support. Thus, this system is as effective as other tag systems, but unlike these more expensive systems, the price of raw starch makes the SBD<sub>tag</sub> system suitable for protein purification for both everyday laboratory work and large-scale production.

**Acknowledgment** D. Guillén, S Moreno-Mendieta, and P. Aguilera were supported by personal grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México. This work is supported by UNAM-DGAPA grants IN209410-3, IN222113, and CONACyT grant 131149. We thank Beatriz Ruiz, Laura Escalante, and Maria Elena Munguía for technical assistance.

## References

- Arnao J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48:1–13
- Belshaw NJ, Williamson G (1990) Production and purification of a granular-starch-binding domain of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* 269:350–353

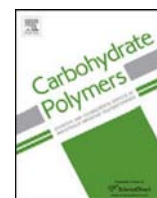
- Carrero SJC (1998) Inmunización oral on antígenos de *Entamoeba histolytica* clonados a través de anticuerpos IgA secretores. Tesis de doctorado en IBB, UNAM
- Chen L, Coutinho PM, Nikolov Z, Ford C (1995) Deletion analysis of the starch-binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein Eng* 8:1049–1055
- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW (2000) The structures of the HC fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* 275:8889–8894
- Guillen D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2007) Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl Environ Microbiol* 73:3833–3837
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Liao H, Myung S, Zhang Y-HP (2012) One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1109–1117
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 41:98–105
- Lin S-C, Lin IP, Chou W-I, Hsieh C-A, Liu S-H, Huang R-Y, Sheu C-C, Chang MD-T (2009) CBM21 starch-binding domain: a new purification tag for recombinant protein engineering. *Protein Expr Purif* 65:261–266
- Olvera CF, Rodríguez-Sanoja R, Prieto GF, Román GAD (2012) Caracterización física y química proximal de paja, grano y almidón de cebada de la variedad esmeralda. *Bio/Technol* 16:9–20
- Osuna J (1989) Aislamiento de un fragmento inmunogénico de toxina tetánica. Tesis de maestría en IBB, UNAM
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Sanchez S (2005a) Microbial starch binding domains. *Curr Opin Microbiol* 8:260–267
- Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Guyot JP, Sanchez S (2005b) The starch binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl Environ Microbiol* 71:297–302
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Michigan
- Structural Genomics Consortium AeFDMB, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural Genomics Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative and SPINE2-Complexes (2008) Protein production and purification. *Nat Meth* 5:135–146
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523–533
- Vretblad P (1974) Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography VIA their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose-beta-amylase system. *FEBS Lett* 47:86–89
- Wan W, Wang D, Gao X, Hong J (2011) Expression of family 3 cellulose-binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:789–798

## Micropartículas de Almidón para la Administración Oral de Antígenos

La búsqueda de sistemas efectivos de administración de proteínas o antígenos vía oral ha sido objeto de constante estudio debido a las ventajas que esta ruta de administración presenta en comparación con otras rutas como la parenteral o subcutánea. Las micropartículas son uno de los sistemas más estudiados para su aplicación vía oral ya que las proteínas inmovilizadas en sustratos nano- o microparticulados son capturadas e incorporadas de mejor manera que cuando se administran de manera libre.

El almidón es un sustrato que de manera natural tiene un tamaño en el rango de las micropartículas y que es usado de manera cotidiana en alimentos y formulaciones farmacéuticas, razón por la cual es una opción viable como un vehículo para la administración oral de proteínas. En un trabajo previo, se empleó el SBD<sub>tag</sub> para llevar a cabo la inmovilización de proteínas de fusión a la superficie de gránulos de almidón y evaluar su estabilidad al ser sometidas *in vitro* a fluido gástrico y fluido intestinal [83]. Lo que se realizó a continuación fue inmovilizar la fusión del fragmento C de la toxina tetánica con el SBD<sub>tag</sub> como antígeno modelo para evaluar la capacidad del gránulo de almidón para llegar a mucosa intestinal y favorecer la presentación y captura del antígeno.

Se observó que al adsorber la fusión al almidón de arroz y administrar vía oral, se favorece la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el antígeno, en comparación a la administración oral de la proteína de fusión pero sin estar adsorbida al almidón, estos resultados demuestran la viabilidad del sistema como un vehículo para la administración de proteínas vía oral.



## Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens



Daniel Guillén<sup>a,b</sup>, Silvia Moreno-Mendieta<sup>a,c</sup>, Ricardo Pérez<sup>a</sup>, Clara Espitia<sup>a</sup>, Sergio Sánchez<sup>a</sup>, Romina Rodríguez-Sanoja<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 February 2014

Received in revised form 6 May 2014

Accepted 18 May 2014

Available online 6 June 2014

#### Keywords:

Starch-binding domain

Microparticle

Oral vehicle

Microparticle vaccine

Protein delivery system

Oral immunization

### ABSTRACT

Microparticles of diverse compositions are often used as carriers for interesting antigens. In this work, we propose the use of natural microparticulated starch as a vehicle for antigens. The proposed system is composed of raw starch microparticles and a starch-binding domain that when fused to another protein, allows for a stable protein immobilization onto the granule surface. To demonstrate the use of starch as an antigen carrier, a fusion combining fragment C of the tetanus toxin with the starch-binding domain was adsorbed to starch and administered orally to mice in two different doses and, importantly, without the use of any adjuvant. The results showed that the system allows the induction of specific antibodies; moreover mice given this immobilized protein presented a delay in the onset of tetanus symptoms compared to mice administered the non-immobilized protein. The study outlines the viability of this immobilization system as an antigen and protein carrier.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Carbohydrate-binding modules (CBMs) are auxiliary domains that are usually found in carbohydrate processing enzymes, but in some instances they can be found as independent proteins. The primary role of a CBM is to promote enzyme attachment to the substrate and to increase the substrate concentration at the active site of a catalytic domain (Bolam et al., 1998). Amylases are among the enzymes with CBMs, specifically, they have a starch-binding domain (SBD) that plays a crucial role in raw starch hydrolysis. The lack of an SBD stops the enzyme adsorption to the insoluble substrate, which is a prerequisite for hydrolytic activity (Rodríguez Sanoja et al., 2000).

The adsorption capacity of the SBD has plenty potential for the field of biotechnology. In a previous study, fusions of a novel tandem arranged SBD (SBD<sub>tag</sub>) and proteins from different microorganisms were constructed. In that work, the SBD<sub>tag</sub> showed its

capacity to immobilize several proteins. It was also used as a tag for protein recovery with only starch as a matrix, indicating that it could be an inexpensive method of recombinant protein purification compared to the currently available technologies (Guillen et al., 2013).

In this work, we propose to use this system as a vehicle for the oral administration of therapeutic proteins or antigens. Using SBD<sub>tag</sub>, the system immobilizes proteins onto starch granules, with sizes in the microparticle range, instead of using chemical immobilization methods or synthetic micro- or nanoparticles, which are both expensive and polluting plus have a questionable biosafety.

Starch is an abundant polysaccharide in nature; it is economic and has already been approved for many alimentary and pharmaceutical uses; properties that make it an attractive candidate for an oral delivery system of proteins, peptides and other biomolecules; it has the advantages of oral administration and eliminates pain to the patient, while it does not require qualified personnel or sterile materials.

In the present study, the effectiveness of raw starch granules at carrying superficially loaded proteins was demonstrated using the green fluorescent protein (GFP). Furthermore, the fragment C of tetanus toxin fused to the SBD<sub>tag</sub> and immobilized on starch microparticles ( $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>) or non-immobilized (niTcSBD<sub>tag</sub>) was used as a model antigen in oral administration assays for the induction of specific antibodies.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56229191/88.

E-mail addresses: [dguillen@biomedicas.unam.mx](mailto:dguillen@biomedicas.unam.mx) (D. Guillén), [silviamoreno.m@gmail.com](mailto:silviamoreno.m@gmail.com) (S. Moreno-Mendieta), [ricasup@yahoo.com](mailto:ricasup@yahoo.com) (R. Pérez), [espitia@biomedicas.unam.mx](mailto:espitia@biomedicas.unam.mx) (C. Espitia), [sersan@biomedicas.unam.mx](mailto:sersan@biomedicas.unam.mx) (S. Sánchez), [romina@biomedicas.unam.mx](mailto:romina@biomedicas.unam.mx) (R. Rodríguez-Sanoja).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbial strains and media

*Escherichia coli* strain BL-21(DE3) [*F*<sup>-ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 (lacI lacUV5-T7gene1ind1 sam7 nin5))</sup>] used for fusion protein production, was grown in Luria–Bertani medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract and 1% NaCl) supplemented with ampicillin (100 μg/mL) for plasmid maintenance.

### 2.2. Protein production and purification

The fusion proteins of GFP or tetanus toxin fragment C (TetC) with the SBD<sub>tag</sub> were constructed previously (Guillén et al., 2013). Briefly, GFP and the TetC gene were amplified by PCR from the templates pRES-hrGFP-1 (Stratagene) and pBR327 + FragBC + COOH (donated by M.S. Munguía, ME), respectively. The amplified fragments were purified from a 1% agarose gel, ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions, and transformed into *E. coli* DH5α by electroporation. The obtained pGEM-T-easy constructs were digested, and the released fragments were ligated to the pQE31-SBD<sub>tag</sub> that was derived from vector pQE31 (QIAGEN). The constructs were named pQGFPsBD<sub>tag</sub> and pQTcSBD<sub>tag</sub>.

*E. coli* BL21(DE3) cells expressing fusion proteins of SBD<sub>tag</sub> and GFP (GFPsBD<sub>tag</sub>) or TetC (TcSBD<sub>tag</sub>) were grown in LB medium supplemented with ampicillin (100 μg/mL) for 12 h at 29 °C (O.D.<sub>600</sub> ≈ 0.5–0.6). Protein expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.1 mM, and incubation was continued at 29 °C for 6 h. Cells were harvested (8000 × g for 10 min at 4 °C) and washed in 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH 7.4 before being lysed. The obtained proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). GFPsBD<sub>tag</sub> and TcSBD<sub>tag</sub> were identified by Western Blotting with a primary anti-His antibody (Roche) and a secondary anti-mouse immunoglobulin G antibody that was labeled with alkaline phosphatase (Perkin-Elmer Life Sciences), according to the manufacturer's instructions.

TcSBD<sub>tag</sub> purification was performed by affinity chromatography according to a previously reported protocol (Guillén et al., 2013), employing the SBD as the affinity tag.

### 2.3. Fluorescence assay with GFPsBD<sub>tag</sub>

Fifty milligrams of corn starch (SIGMA) were washed three times with cold water and suspended in 300 μL of cold citrate–phosphate buffer at pH 5.0. A previously obtained lysate of *E. coli* cells expressing GFPsBD<sub>tag</sub> was added to the starch suspension and incubated on ice for 30 min, protected from light with gentle stirring. After incubation, the starch was washed three times with the same buffer and analyzed by fluorescent microscopy using an Olympus BX-51 microscope and an Olympus DP70 camera. As a control, an *E. coli* lysate containing GFP without the SBD<sub>tag</sub> was also incubated with starch granules and treated to the same conditions.

### 2.4. Antigen adsorption to starch

First, 100 mg of rice starch (SIGMA) was washed twice with 1 mL of cold water and once with 1 mL of 25 mM citrate–phosphate buffer at pH 7.0. Finally, the starch was suspended in 1 mL of the same buffer. The TcSBD<sub>tag</sub> was incubated O.N. with the starch in a protein–starch ratio of 1:50. TcSBD<sub>tag</sub> without starch, as well as the vehicle control, received the same treatment. Adsorption of TcSBD<sub>tag</sub> to the starch was verified using SDS-PAGE and Western Blotting.

### 2.5. Fusion protein administration schedule

Female BALB/c mice, 6–8 weeks old, were orally administered with 0.2 mL of either 25 or 75 μg of μiTcSBD<sub>tag</sub> or niTcSBD<sub>tag</sub>. Some mice were only given starch microparticles as a vehicle control. In all cases, the treatments were administered via the gastric route with a feeding needle (Kent Scientific Corp.). In the administration protocol used in this study, the mice received three doses, with a week-long interval between each dose, and received a boost three weeks after the last administration. The use of an adjuvant was omitted to avoid a false positive response.

### 2.6. Sample preparation

The systemic antibody response was determined by measuring the IgG level in serum. Individual blood samples were taken before and after the gastric administration of the antigen. Blood samples were taken from the tail vein and centrifuged at 8000 rpm for 10 min. Serum was recovered and stored at –20 °C until its use (Wikingson & Sjöholm, 2002).

### 2.7. Humoral response evaluation

Fusion protein TcSBD<sub>tag</sub> was transferred to PVDF membranes for immunoblot assays. Individual membrane lanes containing the protein were cut, and each lane was incubated for 1.5 h at room temperature with serum from the immunized and control groups; the serum was in a 1:1000 dilution in PBS buffer (pH 7.2), Tween 0.05% (PBS-5T) and 3% dry milk. After incubation, the membrane strips were washed in the same buffer three times for 5 min each, and then they were incubated again for 1.5 h with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Invitrogen) diluted in the buffer to a ratio of 1:2500. The membranes were washed three more times, and substrate BCIP/NBT (Invitrogen) was added and incubated with them at room temperature until a signal appeared.

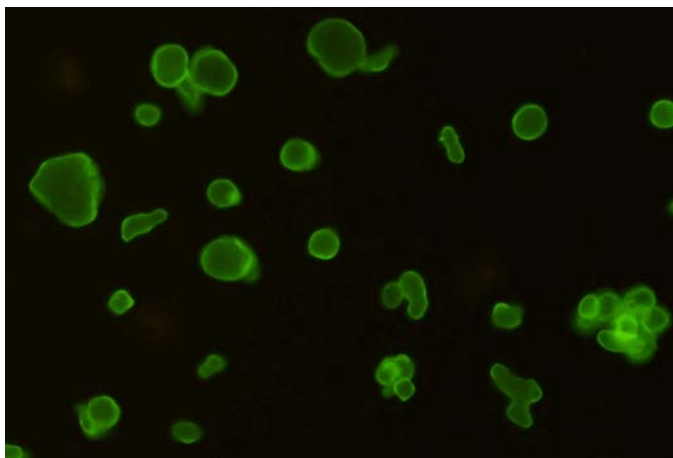
To compare the IgG response, ELISA assays were performed. Costar® 96-well EIA/RIA plates were coated with 100 μL of 10 μg/mL TetC in 0.05 M carbonate buffer at pH 9.6 and incubated overnight at 4 °C. The wells were washed three times with PBS-5T; the plates were then blocked with 3% nonfat dried milk in PBS-5T for 30 min at room temperature, and the washes were repeated. The immune and control sera were diluted to a ratio of 1:500 in PBS-5T, and 100 μL of sample was added to each well. The plates containing samples were incubated for 2 h at 37 °C, followed by a wash step. As a secondary antibody, 100 μL of anti-mouse IgG alkaline peroxidase (Invitrogen) was used at a 1:1000 dilution in PBS-5T, and the plates were incubated for 2 h at 37 °C. The plates were washed again and incubated for 30 min at room temperature with the FAST OPD substrate (SIGMA), and the absorbance at 450 nm was determined on a Multiskan FC (Thermo Scientific). The data were analyzed with a two factor (time and treatment) ANOVA using GraphPad Prism 4 software.

For IgG anti-TetC quantification, the procedure described above for ELISA assays was followed and a standard curve was elaborated using serial dilutions from 1/50 to 1/3200 of pure mouse IgG antibody (Roche), with a stock concentration of 1 mg/mL. The optical density values obtained from the sera of treated mice were extrapolated along the standard curve to determine their antibody concentrations.

### 2.8. Challenging mice with tetanus toxin

Between 0.25 and 50 ng/mouse of commercially available tetanus toxin (SIGMA) was injected subcutaneously in a volume no greater than 30 μL to non-immunized mice to experimentally





**Fig. 1.** An image at 40 $\times$  magnification of starch granules fluorescing after being incubated with *E. coli* lysate containing the fusion protein GFP-SBD<sub>tag</sub>. The fusion protein is able to adsorb to the starch granule and retain its fluorescence capacity.

obtain the LD<sub>100</sub>. The lethal dose was established as the tetanus toxin concentration at which 100% of mice were dead within 48 h.

Seven days after the last fusion protein administration, the treated animals were subcutaneously injected with the determined LD<sub>100</sub> amount of tetanus toxin. The animals were observed closely for signs of paralysis or lameness, and mice that developed symptoms were euthanized. In all of the experiments, the animals were treated according to the accepted protocol by the institution's Animal Care and Use Committee.

### 3. Results

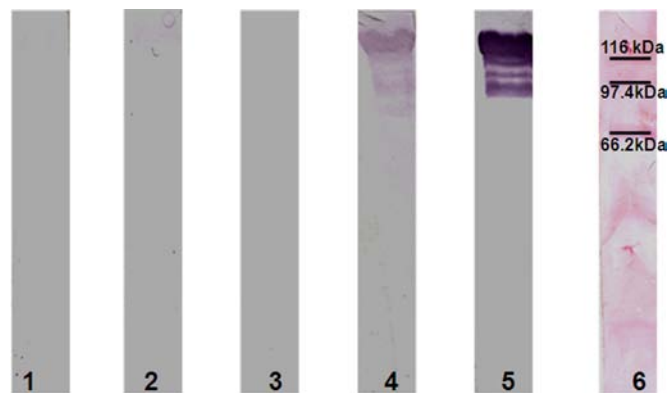
To assess the starch-binding faculty of the SBD<sub>tag</sub> in GFP-SBD<sub>tag</sub>, an *E. coli* lysate containing the fusion protein was incubated with starch granules and washed to avoid unspecific protein binding. When the starch granules were observed under a microscope, an image of fluorescing starch granules was obtained, denoting that the fusion protein had adsorbed to the starch granule (Fig. 1).

In the case of the fusion protein TcSBD<sub>tag</sub>, adsorption to the starch was verified by Western Blotting. The protein was detected in the starch pellet fraction, whereas the supernatant did not reveal any visible signal, indicating that the protein was completely adsorbed onto the starch (results not shown).

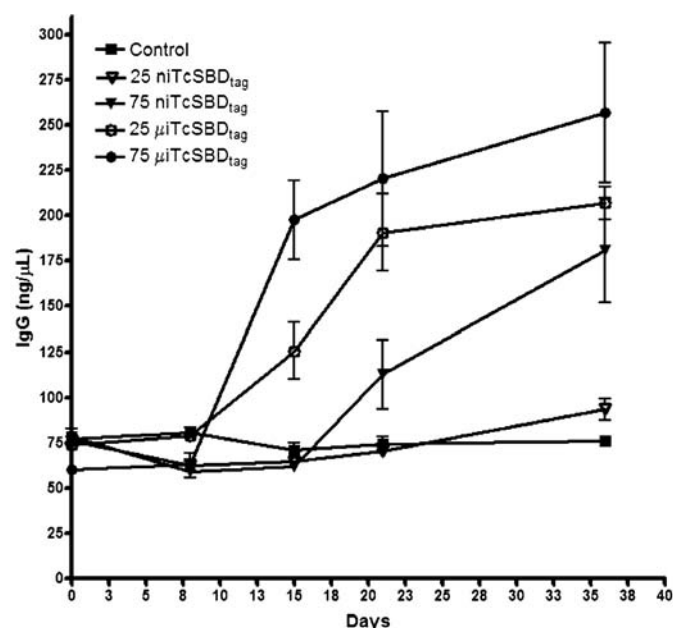
Immunoblotting using the complete fusion protein TcSBD<sub>tag</sub> was performed on the sera collected on day 36 from the administered groups. Although the technique is not as sensitive as ELISA, it is a fast way to qualitatively verify the induction of specific antibodies. When TcSBD<sub>tag</sub> was administered orally, the presence of the specific antibody was favored in the group that received the higher dose of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>, followed by the group given 25  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>. The humoral response in the group administered 25  $\mu$ g of niTcSBD<sub>tag</sub> was not detectable by immunoblot assay, and sera from the control animals, who were administered only starch microparticles, did not show any cross reaction against the fusion protein (Fig. 2).

ELISA assays are more sensitive than immunoblotting and were performed to quantify and compare the humoral specific responses against the target protein TetC. The ELISA results denoted a good response against TetC at the end of the administration protocol, particularly for the group given 75  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>. That group also mounted the best IgG specific response against TetC (Figs. 3 and 4).

It was observed that the mice immunized with 25 and 75  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub> showed the fastest humoral response. Their responses began in just 15 days while the groups receiving the niTcSBD<sub>tag</sub> did not begin showing a response until day 36, without ever reaching



**Fig. 2.** An immunoblot with the sera of the different groups administered. 1: 25  $\mu$ g of niTcSBD<sub>tag</sub>; 2: 75  $\mu$ g of niTcSBD<sub>tag</sub>; 3: the control, given only starch microparticles; 4: 25  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>; 5: 75  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub>; and 6: MWM.



**Fig. 3.** Evaluation of the specific IgG against protein TetC in the mice immunized by single doses of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub> or niTcSBD<sub>tag</sub> with seven-day intervals between each administration.

the IgG levels obtained with the same amount of protein adsorbed to the starch granules. All of the mentioned differences were statistically significant, with  $p < 0.05$ .

To test the biological activity of the observed responses, the orally immunized mice were challenged subcutaneously with a lethal dose of tetanus toxin that was experimentally established (12.5 ng/mouse). A delay in symptom development was observed when the groups were treated with  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub> when compared to the control group, which received only starch. The control group showed clear signs of tetanus within 36 h after a subcutaneous injection of tetanus toxin, while the mice given 75  $\mu$ g of niTcSBD<sub>tag</sub> or 25  $\mu$ g  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub> showed a 24 h delay in symptom appearance. The group that received 75  $\mu$ g of  $\mu$ iTcSBD<sub>tag</sub> had a larger delay of up to 36 h (Fig. 5).

### 4. Discussion

After proving that GFP could be immobilized to a starch granule through the SBD and fluoresce, we explored other proteins as fusion partners, aiming to use the starch microparticles as vehicles for

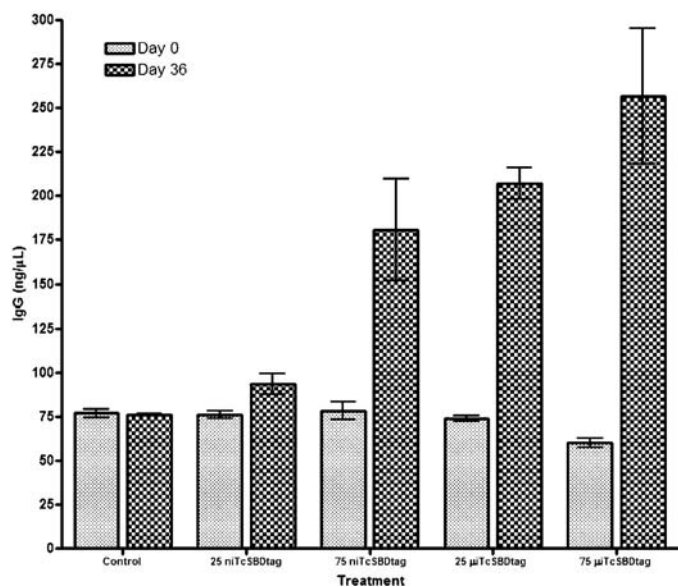


Fig. 4. A comparison of the specific IgG response against antigen TetC at day 0 and day 36 of the dose administration, before the tetanus toxin challenge.

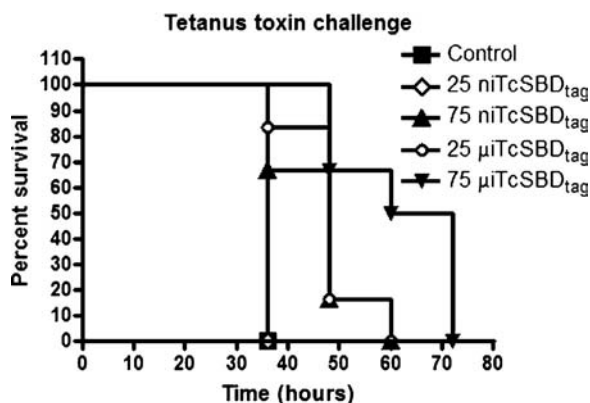


Fig. 5. A comparison of mice survival following a tetanus toxin injection seven days after their last TcSBD<sub>tag</sub> administration.

mucosal antigen delivery. To prove that the proposed SBD<sub>tag</sub>-starch system can act as a vehicle for the oral administration of therapeutic proteins and antigens, the induction of specific antibodies against the protein/antigen was evaluated. This induction could indicate that the proteins were properly stabilized and able to reach the sites of immune response induction, located in the gut associated lymphoid tissue (GALT).

Microparticulated systems for antigen delivery enhanced both the antigen's stability in the gastrointestinal tract and the capture of the desired proteins or peptides (O'Hagan, 1998). Frequently, these systems use chemical cross-linking to attach or trap proteins to the microparticle's surface (Andrianov & Payne, 1998). We used a SBD<sub>tag</sub> to bind an antigen to natural starch granules, thus avoiding chemical reagents or conditions that could affect the immunogenicity of an antigen (Andrianov & Payne, 1998; O'Hagan, 1998; Rajapaksa & Lo, 2010). Therefore, we are proposing this starch complex as a simple and inexpensive carrier of peptides or proteins of interest.

The starch granule, loaded with the fusion protein TcSBD<sub>tag</sub>, was used as a carrier for intragastric TetC delivery. Oral administration must manage two important aspects to succeed. First, the antigens must pass through the barriers of the digestive tract (containing proteases and at a pH range of 1–4) to reach the intestinal environment. Second, the antigens must be captured by specialized cells

located in the intestinal epithelium and transported to the GALT, where the antigen presenting cells and other immune system cells are located (Andrianov & Payne, 1998; O'Hagan, 1998; Wikingsson & Sjöholm, 2002). The harsh conditions of pH and proteases could be detrimental to the fusion proteins or their adsorption to starch affecting thus the antigen delivery, however, preceding work had already demonstrated that proteins fused to the SBD<sub>tag</sub> and previously immobilized onto the surface of starch granules present improved stability when incubated *in vitro* with gastric and intestinal fluids, compared to the same proteins in soluble form, even using the simulated fluids that usually result in more drastic conditions than those presented in natural gastric or intestinal fluids (Moreno-Mendieta, Guillén, Sánchez, Espitia, & Rodríguez-Sanoja, submitted for publication).

Regarding antigen capture, microparticles up to 10 μm in diameter are transported by specialized M cells from the intestinal epithelium and remain into the Peyer's patches, while microparticles up to 5 μm can be transported through the efferent lymphatics to the other mucosal associated lymphoid tissue (MALT) and the spleen (Eldridge et al., 1990). Depending on the botanical source, starch granules have different sizes. In this study, rice starch was selected as the matrix for fusion protein adsorption and delivery. The average size of the rice starch granule is 4–5 μm (Hossen et al., 2011), a dimension that allows effective capture and transportation to MALT.

The immune response can also be affected by factors such as the nature of the vehicle, the use of an adjuvant, the antigen dose and the administration protocol (Raghuvanshi et al., 2002). To evaluate the ability of the system to withstand the low gastric pH and intestinal enzymes, which allows the bound protein to reach the specialized cells responsible for eliciting an immune response in the intestinal epithelium, different protein doses were employed using a natural microparticulated substrate. No adjuvant was used because its addition could enhance the antibody response and then the measured induction effect could be unrelated to the system's ability to carry the antigen.

With the administration protocol used in this study, we observed that the mice receiving the larger dose of starch-adsorbed antigen (75 μg of μiTcSBD<sub>tag</sub>) developed the most important response. Doses of 25 μg of μiTcSBD<sub>tag</sub> and 75 μg of niTcSBD<sub>tag</sub> elicited similar IgG responses against TetC. However, the group that was administered 25 μg of niTcSBD<sub>tag</sub> did not develop any response against the antigen. This result indicates that the devised system allows the antigen to be recognized and presented to MALT.

The humoral response enhancement is also related to the stability conferred by the protein's immobilization and the size of the particle. In this instance, the starch granules loaded with TcSBD<sub>tag</sub> allowed and facilitated antigen capture in the sites of immune induction. Another important factor is the mucoadhesive properties of natural starch since bioadhesive polymers increase the residence time (Sarawathi, Balaji, & Umashankar, 2013). In this particular case, starch may retard the clearance time in the intestine, allowing the microparticles to be more effectively captured, with the advantage of using a natural substrate that do not have adverse effects on the mucosal tissue that other synthetic systems do (Adriaens, Ameye, Dhondt, Foreman, & Remon, 2003).

The mice that were challenged with lethal doses of tetanus toxin responded differently depending on their received treatment. The animals given μiTcSBD<sub>tag</sub> developed symptoms later than the mice administered niTcSBD<sub>tag</sub> or starch alone. These results are related to those observed in the ELISA assays, in which the group that presented the greatest increase in specific IgG production (75 μg μiTcSBD<sub>tag</sub>) also showed a delay in intoxication.

Although no total protection against the toxin was observed, it is remarkable that the system stimulated some protection, as shown by the delay in symptom development. No further assumption may

be made regarding the degree of protection because the mice were euthanized just after the first symptoms occurred. No adjuvant was used in this study, as opposed to other systems tested for the generation of a protective response against tetanus, which besides the use of adjuvants; use more responsive immunization routes, such as the subcutaneous route (Charles et al., 1991; Fairweather, Lyness, & Maskell, 1987). Regarding oral administration systems, live microorganisms such as *Salmonella*, *Lactobacillus* strains and *Bacillus subtilis* spores have been tested as potential carriers (Abd El Ghany et al., 2007; Duc, Hong, Fairweather, Ricca, & Cutting, 2003; Reveneau, Geoffroy, Locht, Chagnaud, & Mercenier, 2002), with good antibody response induction against TetC; although no tetanus challenge has been performed (Abd El Ghany et al., 2007; Reveneau et al., 2002). Regrettably, one of the problems encountered is the need to use attenuated strains when pathogens are employed as carriers. Additionally, there are safety concerns with the release of genetically modified strains into nature, even strains considered GRAS.

Non-living vehicles have also been tested to induce a humoral response against tetanus; for example, chitosan microparticles demonstrated that the oral administration of microparticles with immobilized antigens is an adequate strategy to induce a good humoral response (Ahire, Sawant, Doshi, & Ravetkar, 2007). Furthermore, microparticles generated with acryloylated starch and chemically conjugated to human serum albumin have been reported to induce a strong humoral response in mice after oral administration (Wikingsson & Sjöholm, 2002).

Concerning the efficiency of different systems and immunization routes to generate protection against tetanus, in recent years, lots of work has been done specially with microorganisms expressing TetC with different results obtained. The efficiency of the systems depend of factors like the immunization route which includes the intranasal (Lee et al., 2010; Reveneau et al., 2002), sublingual (Amuguni et al., 2011), subcutaneous (Reveneau et al., 2002) and intragastric (Grangette et al., 2002; Lee et al., 2010; Reveneau et al., 2002), although immunization by different routes was able to induce an immune response, for intragastric administration no reproducibility has been reported (Lee et al., 2010) or the need of high cell quantities ( $10^8$ – $10^9$ ) of high expression TetC strains to achieve antibody induction (Grangette et al., 2002; Reveneau et al., 2002).

Biodegradable particles, of Poly lactide-co-glycolide (PLGA) and polylactide (PLA), entrapping tetanus toxoid (TT) were efficient to induce antibodies when they were administered to rats intramuscularly with an adjuvant (Raghuvanshi et al., 2002), however the protection capacity of these antibodies was not reported. Subcutaneously administration of TT-PLGA microspheres with trehalose or TT-chitosan microspheres with trehalose to mice and guinea pigs also induced antibodies when the adjuvant alum was employed (Alonso, Gupta, Min, Siber, & Langer, 1994; Jaganathan et al., 2005). As far as we know, there are no works that demonstrate any degree of protection to tetanus by oral or intragastric administration of TetC.

Finally, comparing the various systems available, the set-up proposed in this work simplifies antigen immobilization and eliminates the need for a microparticle production process, thus reducing the production costs. In addition, because starch is part of the daily diet and is a non-immunogenic substrate, reduces the background response that could be elicited against the vehicle, as occurs with genetically modified living organisms.

## 5. Conclusions

The efficiency of starch granules as vehicles for protein delivery via a starch-binding domain was demonstrated. The system allows

for and facilitates antigen capture in the sites of immune induction, as measured by the humoral response induction. In addition, the system allows the fusion proteins to reach the intestinal environment, which suggests that the system could be used not only as a vehicle for antigens but also as a carrier for therapeutic proteins and peptides to benefit gastrointestinal health, a perspective that is currently under evaluation.

## Acknowledgment

This work was part of the doctoral thesis of Guillén D. in the Ph.D. in Biochemical Sciences at UNAM. D. Guillén and S. Moreno-Mendieta were supported by personal grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México. This work is supported by UNAM-DGAPA grants IN209410, IN222113, and CONACyT grant 131149. We thank Beatriz Ruiz and Rafael Cervantes for technical assistance.

## References

- Abd El Ghany, M., Jansen, A., Clare, S., Hall, L., Pickard, D., Kingsley, R. A., et al. (2007). Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype Typhimurium vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infection and Immunity*, 75(4), 1835–1842.
- Adriaens, E., Ameye, D., Dhondt, M. M. M., Foreman, P., & Remon, J. P. (2003). Evaluation of the mucosal irritation potency of co-spray dried Amioca®/poly(acrylic acid) and Amioca®/Carbopol® 974P mixtures. *Journal of Controlled Release*, 88(3), 393–399.
- Ahire, V. J., Sawant, K. K., Doshi, J. B., & Ravetkar, S. D. (2007). Chitosan microparticles as oral delivery system for tetanus toxoid. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33(10), 1112–1124.
- Alonso, M. J., Gupta, R. K., Min, C., Siber, G. R., & Langer, R. (1994). Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, 12(4), 299–306.
- Andrianov, A. K., & Payne, L. G. (1998). Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 155–170.
- Amuguni, J. H., Lee, S., Kerstein, K. O., Brown, D. W., Belitsky, B. R., Herrmann, J. E., et al. (2011). Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine*, 29(29–30), 4778–4784.
- Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M. P., Rixon, J. E., et al. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal*, 331(3), 775–781.
- Charles, I. G., Rodgers, B. C., Makoff, A. J., Chatfield, S. N., Slater, D. E., & Fairweather, N. F. (1991). Synthesis of tetanus toxin fragment C in insect cells by use of a baculovirus expression system. *Infection and Immunity*, 59(5), 1627–1632.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Fairweather, N., Ricca, E., & Cutting, S. M. (2003). Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infection and Immunity*, 71(5), 2810–2818.
- Eldridge, J. H., Hammond, C. J., Meulbroek, J. A., Staas, J. K., Gilley, R. M., & Tice, T. R. (1990). Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *Journal of Controlled Release*, 11(1), 205.
- Fairweather, N. F., Lyness, V. A., & Maskell, D. J. (1987). Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 55(11), 2541–2545.
- Grangette, C., Müller-Alouf, H., Geoffroy, M.-C., Goudercourt, D., Turneer, M., & Mercenier, A. (2002). Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: Impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine*, 20(27–28), 3304–3309.
- Guillen, D., Moreno-Mendieta, S., Aguilera, P., Sanchez, S., Farres, A., & Rodríguez-Sanoja, R. (2013). The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4141–4148.
- Hossen, M. S., Sotome, I., Takenaka, M., Isobe, S., Nakajima, M., & Okadome, H. (2011). Effect of particle size of different crop starches and their flours on pasting properties. *Japan Journal of Food Engineering*, 12(1), 29–35.
- Jaganathan, K. S., Rao, Y. U. B., Singh, P., Prabakaran, D., Gupta, S., Jain, A., et al. (2005). Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: A comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 294(1–2), 23–32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lee, S., Belitsky, B. R., Brown, D. W., Brinker, J. P., Kerstein, K. O., Herrmann, J. E., et al. (2010). Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*, 28(41), 6658–6665.
- Moreno-Mendieta, S. A., Guillén, D., Sánchez, S., Espitia, C., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). Gastrointestinal stability of proteins immobilized on raw starch microparticles (submitted for publication).
- O'Hagan, D. T. (1998). Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 305–320.

- Raghuvanshi, R. S., Katare, Y. K., Lalwani, K., Ali, M. M., Singh, O., & Panda, A. K. (2002). Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 245(1), 109–121.
- Rajapaksa, T. E., & Lo, D. D. (2010). Microencapsulation of vaccine antigens and adjuvants for mucosal targeting. *Current Immunology Reviews*, 6(1), 29–37.
- Reveneau, N., Geoffroy, M.-C., Locht, C., Chagnaud, P., & Mercenier, A. (2002). Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine*, 20(13), 1769–1777.
- Rodriguez Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N., & Guyot, J. P. (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3350–3356.
- Saraswathi, B., Balaji, A., & Umashankar, M. S. (2013). Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 423–430.
- Wikingsson, L. D., & Sjöholm, I. (2002). Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*, 20, 3355–3363.

## Estudio de un Segundo Esquema de Administración de Micropartículas de Almidón

Las vacunas tienen por objeto sensibilizar al organismo contra agentes infecciosos para desarrollar una respuesta protectora que puede ser de tipo celular o humoral, dicha respuesta se puede ver afectada por el régimen de inmunización seleccionado. Después del primer estudio realizado con las micropartículas de almidón como vehículo de antígenos, se probó un segundo esquema de administración vía oral con la misma fusión entre TetC y el SBD<sub>tags</sub>, con el objetivo de observar si se presentaba diferencia en la respuesta humoral ya sea en cuanto a los tiempos de inducción, la dosis de antígeno requerida, los niveles de anticuerpo producidos y si esto repercutía en una mejor protección en los retos con la toxina tetánica.

Los resultados obtenidos demostraron que al cambiar el esquema de inmunización se favorece la respuesta con la dosis más baja de proteína adsorbida y la dosis más alta de proteína sin adsorber, observándose para ambos casos un 20% de supervivencia al reto con la toxina. Esto demuestra que con el sistema se puede disminuir la dosis de proteína administrada y aún así obtener los mismos resultados que se observan cuando se administran dosis más altas de proteína sin adsorberse al almidón.

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un sistema complejo de barreras físicas, fisiológicas, células efectoras, células que procesan y presentan antígenos, citocinas, etc. Por lo mismo, cuando se desea inducir una respuesta específica contra uno o varios antígenos se deben hacer pruebas con diferentes protocolos de inmunización ya que varios factores pueden afectar el resultado final, como la dosis y concentración de antígeno, el uso de adyuvantes y el tiempo entre cada administración, por mencionar algunos ejemplos.

El tener un esquema de administración definido para un antígeno seleccionado puede servir como guía, pero dependiendo de la naturaleza de cada antígeno a probar puede ser necesario hacer modificaciones al esquema. Una cantidad determinada de antígeno puede ser suficiente como para inducir una respuesta vigorosa y prolongada, mientras que al aumentar la cantidad se puede estimular la producción de anticuerpo, sin embargo, estos pueden presentar baja afinidad o incluso si la dosis de antígeno es muy alta se puede generar tolerancia inmunológica [84].

Los refuerzos también juegan un papel importante; la dosis suministrada puede ser una repetición de la administrada originalmente o se puede variar la dosis, incorporar adyuvantes, cambiar la ruta de administración. La finalidad de esto es inducir una respuesta que sea lo suficientemente fuerte, específica y de larga duración como para sensibilizar al organismo y protegerlo contra el agente original que porta los antígenos reconocidos como extraños [84].

En el capítulo previo se demostró la inducción de anticuerpos específicos contra TetC al administrar a ratones con gránulos de almidón con la proteína de fusión TcSBD<sub>tag</sub> inmovilizada en su superficie. Con la finalidad de evaluar si se presentan cambios en la producción de anticuerpos y/o en la protección al retar al modelo con la toxina del tétanos, se probó un segundo esquema de inmunización usando las mismas dosis de proteína inmovilizada y libre pero cambiando los intervalos de administración de las dosis y los refuerzos tomando en cuenta esquemas de inmunización oral donde se administra el antígeno en dosis continuas pero con un mayor intervalo de tiempo entre los refuerzos [6].

## MÉTODOS

### *Producción de TcSBD<sub>tag</sub>*

Para la producción de la proteína de fusión TcSBD<sub>tag</sub> se utilizó a la cepa de *Escherichia coli* BL-21(DE3) [*F<sup>-</sup>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 (lacI lacUV5-T7gene1ind1 sam7 nin5))*].

La bacteria se creció en medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina a 100 µg/mL por 12 h a 29 °C (D.O.<sub>600</sub> ≅ 0.5-0.6). La expresión de la proteína se indujo adicionando IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se continuó

la incubación por 6 h más. Posteriormente se cosecho a las células centrifugando a 8000 rpm por 10 min a 4°C y se lavaron con buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM a pH 7.4, se repitió el paso de centrifugación y las células se guardaron a -20 °C hasta su uso.

#### *Purificación de TcSBD<sub>tag</sub>*

La purificación se llevo a cabo de acuerdo al protocolo previamente establecido (Capítulo 3) . En general, lo que se hizo fue resuspender el botón de 1 L de cultivo en buffer citrato-fosfato 20mM pH 7.0 (CP) y lisar por sonicación dando tres pulsos de 60 Hz por 10 s y dejando reposar 1 min entre cada pulso. El lisado se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 15000 rpm y se aparto el sobrenadante. El botón celular se resuspendió nuevamente en 500  $\mu\text{L}$  del mismo buffer y se sonicó dando tres pulsos de 20 s de duración y al finalizar se juntó el nuevo lisado con el sobrenadante obtenido anteriormente. Nuevamente se centrifugó a 15000 rpm durante media hora y se colectó el sobrenadante donde se encuentra la proteína de fusión.

Se filtró el sobrenadante para eliminar detritos celulares por membrana de 0.8  $\mu\text{m}$  y luego por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante ya filtrado se pasó por una columna de sefarosa acoplada a  $\beta$ -ciclodextrina que previamente había sido equilibrada con buffer CP. La columna se lavó exhaustivamente hasta tener una lectura de absorbancia constante, momento en el cual se le hizo pasar 70 mL de una solución de  $\beta$ -ciclodextrina en buffer CP a una concentración de 9 mg/mL para eluir de la resina a la proteína de fusión. Las fracciones colectadas se analizaron en un gel SDS-PAGE y aquellas conteniendo a la proteína de fusión se dializaron exhaustivamente contra buffer CP.

#### *Preparación del almidón*

Se pesaron 100 mg de almidón de arroz (SIGMA) y se resuspendieron en 1 mL de agua fría, la suspensión se centrifugó a 6000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante, el lavado del almidón se repitió en dos ocasiones más y se le realizó un último lavado con buffer CP. Finalmente se resuspendió al almidón en un volumen final de 1 mL del mismo buffer, para tener una concentración final de 100 mg de almidón/mL.

#### *Adsorción de TcSBD<sub>tag</sub>*

Dosis de 75  $\mu\text{g}$  y 25  $\mu\text{g}$  de la proteína de fusión TcSBD<sub>tag</sub> en buffer CP se mezclaron toda la noche a 4°C con la suspensión preparada de almidón de arroz a una razón proteína:almidón de 1:50, posteriormente las muestras se centrifugaron y se descartó el sobrenadante, el botón se resuspendió con buffer CP en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . La proteína TcSBD<sub>tag</sub> pero sin almidón y el control consistente solo en almidón, recibieron los mismos tiempos de incubación.

### *Inmunización y toma de muestra*

Se administró por vía oral con una sonda intragástrica (Feeding Needle 22GA, Kent Scientific Corp.) a ratones hembra Balb/c de seis semanas de edad con diferentes dosis de la proteína TcSBD<sub>tag</sub> (25 µg y 75 µg) adsorbida al almidón de arroz. Las administraciones se realizaron dos días consecutivos y aplicando refuerzos otros dos días consecutivos, a los 20, 21, 40 y 41 días después de la primera inmunización. Con el mismo esquema se administró las mismas dosis de proteína soluble sin adsorber a otros grupos y al grupo control que recibió solo almidón. En cada fecha de inmunización y una semana después de la última dosis se sangró a los ratones de la vena lateral de la cola y las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min, posteriormente se recuperó el suero y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### *Análisis de la respuesta inmune*

La presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados, se llevó a cabo de manera cualitativa mediante la técnica de inmuno-blot y de manera cuantitativa por ELISA.

La metodología que se siguió para la visualización de anticuerpos es la que se describió previamente (Capítulo 4). Brevemente, para el inmunoblot se transfirió la proteína TcSBD<sub>tag</sub> a distintas membranas de PVDF (Immobilon<sup>TM</sup>, Millipore) y posteriormente cada membrana se incubó con uno de los sueros provenientes de los distintos grupos en buffer PBS Tween 20 al 0.5 % (PBS-5T) con leche descremada al 3 %, por 1.5 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la membrana tres veces con el mismo buffer por cinco minutos, al final de los lavados se colocó la membrana buffer pero ahora adicionado anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) y se incubó por 1.5 h a temperatura ambiente, al término se lavó la membrana y se reveló con sustrato (BCIP/NBT Kit, Invitrogen).

Para los ensayo de de ELISA de inmunoglobulinas IgG anti-TetC, placas de 96 pozos COSTAR 3590 fueron sensibilizadas con TetC (10 µg/mL) en buffer de carbonatos pH 9.6 a 4°C, O.N. Las placas se lavaron con PBS-5T y se bloquearon durante media hora con leche descremada al 3%. Pasada la incubación las placas se lavaron y se agregaron las muestras de suero y se incubó a 37 °C por 2 h. Posteriormente, se agregó anticuerpo secundario (Invitrogen G21040) en una dilución 1:1000 en PBS-5T. Nuevamente se incubó por dos horas a 37 °C y se lavó al final. Para revelar las placas se agregó el sustrato SIGMA FAST OPD por 30 min y las placas se leyeron a 450 nm.

Para la cuantificación de IgG específica contra TetC, se elaboró una curva estándar de inmunoglobulina G de ratón (Roche), para la cual se inmovilizaron en placa diluciones seriales de IgG desde 1/50 hasta 1/3200 a partir de un stock de anticuerpo de 1 mg/mL. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón fabricado en cabra y acoplado a peroxidasa, las incubaciones y lavados se siguieron de acuerdo al procedimiento descrito arriba para los ensayos de ELISA. Para facilitar el análisis, la curva obtenida al graficar D.O. 450 nm contra la concentración de



IgG se linealizó y graficó mediante el método de dobles recíprocos y los valores de densidad óptica obtenidos de los sueros de los ratones inmunizados fueron interpolados en la curva estándar.

### *Prueba de Protección*

Para comprobar que la respuesta observada era protectora, se retó a los ratones con toxina tetánica (Sigma), la cual se administró por vía subcutánea en el flanco derecho. La dosis utilizada fue de 12.5 ng por ratón y los animales se mantuvieron bajo observación por 4 días. En caso de presentarse síntomas como rigidez muscular, el animal se sacrificó y se documentó ese tiempo. Los ratones que sobrevivieron después de 4 días se consideraron protegidos.

## **RESULTADOS**

La proteína de fusión TcSBD<sub>tag</sub> se incubó con el almidón de arroz y se verificó la adsorción al gránulo por Western-blot. El almidón se compactó en un pellet al centrifugarlo y se analizó la presencia de la proteína de fusión, la fracción correspondiente al sobrenadante también se analizó en busca de TcSBD<sub>tag</sub> que no se hubiera adsorbido. El revelado detectó a la fusión TcSBD<sub>tag</sub> en el almidón mientras que en el sobrenadante no se observó ninguna señal visible (Fig. 9).

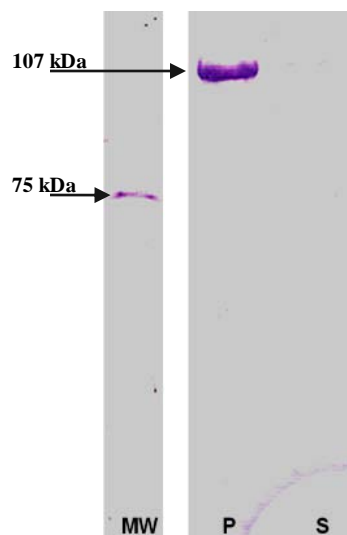


Figura 9. Western-blot para detectar la presencia de la proteína de fusión TcSBD<sub>tag</sub> en el pellet de almidón de arroz (P) o en el sobrenadante (S) después de la incubación. Marcador de peso molecular (MW).

Al realizar el análisis cualitativo por inmuno-blot con el suero del día 41, se observó que todos los grupos administrados presentaron anticuerpos contra TcSBD<sub>tag</sub>, sin embargo el grupo donde se observó una señal con mayor intensidad corresponde al que recibió 25 µg de proteína adsorbida al almidón mientras que el suero proveniente del grupo control no reconoció a la proteína de fusión (Fig. 10).

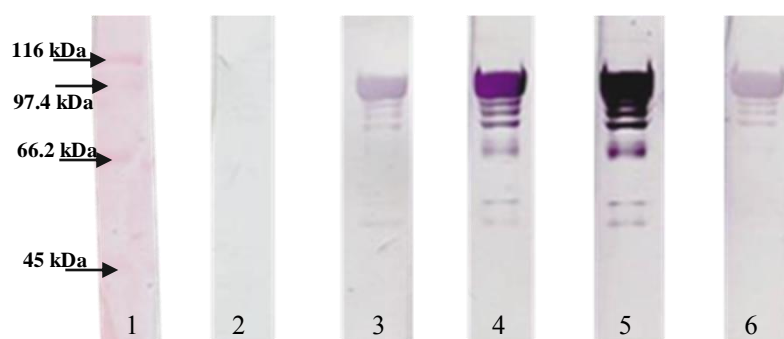


Figura 10. Inmunoblot realizado con el suero de 41 días de los diferentes grupos de ratones inmunizados con dos dosis consecutivas. 1) MW. 2) Grupo control. 3) Grupo administrado con 25 µg de TcSBD<sub>tag</sub> no adsorbida. 4) 75 µg de TcSBD<sub>tag</sub> no adsorbida. 5) 25 µg de TcSBD<sub>tag</sub> adsorbida al almidón de arroz. 6) 75 µg TcSBD<sub>tag</sub> adsorbida al almidón de arroz. Las múltiples bandas observadas corresponden al reconocimiento de la proteína TcSBD<sub>tag</sub> completa y fragmentada por degradación del SBD<sub>tag</sub>.

Para comparar cuantitativamente la respuesta humoral sistémica montada contra el antígeno TetC, se realizaron pruebas de ELISA sensibilizando placas solo con TetC y no con la proteína de fusión completa TcSBD<sub>tag</sub>. De acuerdo a los resultados observados en el inmunoblot, la prueba de ELISA demostró que el grupo al que se administró 25 µg de TcSBD<sub>tag</sub> fue el que presentó una mayor producción de anticuerpos IgG contra TetC, seguido del grupo que recibió 75 µg de TcSBD<sub>tag</sub> sin almidón. Los otros dos grupos correspondientes a 25 µg de TcSBD<sub>tag</sub> sin almidón y 75 µg de TcSBD<sub>tag</sub> adsorbida al almidón tuvieron un comportamiento similar donde apenas se observó un ligero incremento (Fig. 11).

1

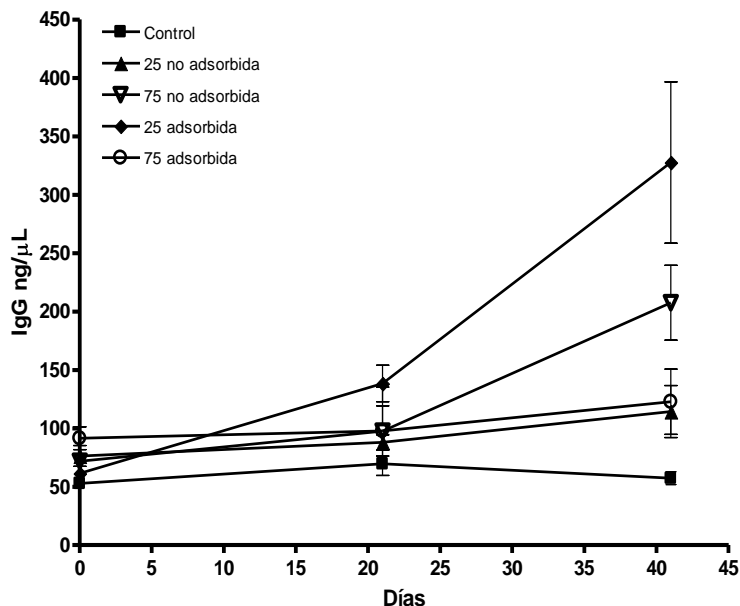


Figura 11: Evaluación de IgG contra el antígeno TetC en ratones inmunizados con dosis consecutivas de TcSBD<sub>tag</sub> sin almidón o adsorbida al almidón y un intervalo de veinte días entre cada administración. Las barras de error denotan la desviación estándar.

En el reto con toxina tetánica, los animales del grupo control mostraron síntomas y fueron sacrificados durante las primeras 48 h después del reto, mientras que los grupos inmunizados con 25 μg de TcSBD<sub>tag</sub> adsorbida al gránulo de almidón y los que recibieron las dosis de 75 μg de TcSBD<sub>tag</sub> no adsorbida, tardaron más tiempo en presentar síntomas. Al final, el 20 % de estos grupos sobrevivió al reto y fueron mantenidos en observación por dos semanas más sin que se mostrara signo de la intoxicación (Fig. 12).

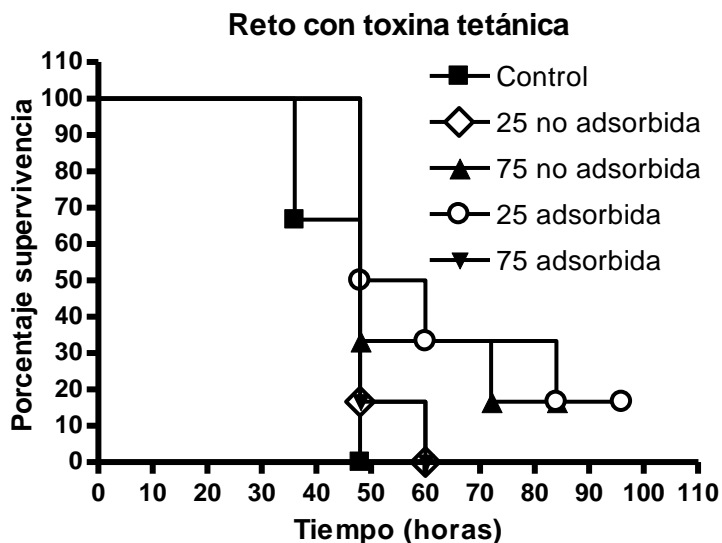


Figura 12: Supervivencia de los diferentes grupos de ratones tratados a los que se reto con toxina tetánica 7 días después de completar el esquema de inmunización.

## DISCUSIÓN GENERAL

Con el aumento de la producción de proteínas recombinantes usadas comúnmente y el interés por explotar nuevas proteínas, se ha incrementado también la necesidad de métodos rápidos y sencillos que no solo permitan recuperar a las proteínas de manera eficiente sino también disminuir los costos de operación.

Una de las estrategias más usadas es aprovechar la afinidad que puedan tener las proteínas por un ligando para selectivamente separarlas del resto de proteínas no deseadas, dicho ligando puede ser sintético, el cual emula o proviene de una fuente natural, o bien puede ser directamente el sustrato natural. Estos últimos ligandos están basados en biomoléculas como heparina, gelatina, anticuerpos monoclonales, proteínas de unión o receptores, carbohidratos. En este sentido, la afinidad que tienen los CBM por diferentes carbohidratos, es una propiedad que puede ser aprovechada con distintos fines.

Para ello, es importante la racionalización del conocimiento que se tiene de los CBM, en cuanto a cómo se lleva a cabo la interacción proteína-carbohidrato, las determinantes estructurales que influyen en el reconocimiento específico de los azúcares, la afinidad que presentan por sus sustrato, etc. El estudio y comprensión de los CBM es un campo que se encuentra en expansión como se refleja en el aumento de familias de CBM en la base de datos CAZy [35] y en la continua resolución de las estructuras de estas proteínas (Cap. 2).

En esta tesis se estudiaron algunas de las posibles aplicaciones que tiene el SBD<sub>tag</sub> como etiqueta de inmovilización de proteínas. Primero se desarrolló la idea de utilizarlo como un dominio o etiqueta de afinidad en proteínas de fusión, obteniéndose como resultado proteínas recombinantes que adquieran la capacidad de unirse al almidón insoluble o a análogos de este sustrato con fines de inmovilizar y/o purificar a las proteínas.

La unión de proteínas a través de un dominio de afinidad a ligando se suele realizar con diversos sistemas (Cap. 3, Tabla 1), sin embargo, en su mayoría se emplean para llevar a cabo la purificación de proteínas y no con otros fines, principalmente por que los soportes que se utilizan en estas tecnologías suelen tener un costo alto asociado. La ventaja del SBD<sub>tag</sub> es que es afín al almidón, un sustrato que es abundante en la naturaleza, económico e inocuo lo que permite no solo manejar pequeños volúmenes sino también escalar los procesos en caso de ser requerido y además usarlo como plataforma de inmovilización de proteínas con fines analíticos, biotecnológicos o biomédicos por citar algunos campos.

Con el fin de comprobar que se pueden generar proteínas de fusión con afinidad al almidón o moléculas análogas a este sustrato, se incubó un extracto total de proteínas de *E. coli* conteniendo la fusión GFPSBD<sub>tag</sub>, con gránulos de almidón de maíz, obteniéndose al final gránulos de almidón fluorescentes (Cap. 4, Fig.1). Esto es indicativo de dos importantes aspectos, el primero se refiere a que se está llevando a cabo una efectiva adsorción al gránulo de almidón

con una técnica de un solo paso y sin la necesidad de manejar condiciones o reactivos especiales, tal y como se describe en los métodos del cuarto capítulo.

El segundo aspecto se refiere a que la GFP retiene su capacidad de fluorescer, lo que indica que la fusión del SBD<sub>tag</sub> no afecta el plegamiento de la proteína a la cual se encuentra adyacente ya que esta conserva su actividad, lo cual depende entre otros factores, de conservar el plegamiento adecuado de barril- $\beta$  con el grupo cromóforo en el centro del barril [85]. La mención de estos aspectos es importante ya que como etiqueta de afinidad “ideal” se busca que simplifique el proceso de purificación de proteína reduciendo la necesidad de equipo, capital, material, etc., mientras que aumenta su recuperación; por otro lado, también se busca que no interfiera con la actividad biológica de la enzima o péptido de interés, en este sentido, es necesario verificar con otras proteínas reporteras o enzimas que el SBD<sub>tag</sub> no afecta su actividad biológica para demostrar que se puede emplear con diversas proteínas de interés.

Aunque la GFPSBD<sub>tag</sub> demostró su capacidad de adsorberse al almidón y mantener actividad, era necesario evaluar si el sistema permitía recuperar a la proteína a partir del extracto bacteriano, para ello se llevaron a cabo pruebas de adsorción y purificación incluyendo otras tres proteínas de fusión con la finalidad de comprobar la funcionalidad del sistema con proteínas de distintos orígenes y tamaño (Cap. 3, Fig. 1) y se comparó el sistema con el de la etiqueta de histidinas por ser uno de los más comúnmente utilizados. La primera prueba de purificación de las fusiones con el SBD<sub>tag</sub> se realizó por cromatografía de afinidad con una columna de  $\beta$ -ciclodextrina acoplada a sefarosa ya que la  $\beta$ -ciclodextrina es una molécula análoga del almidón y por tanto reconocida por el SBD<sub>tag</sub>. La comparación cualitativa entre el SBD<sub>tag</sub> y la etiqueta de histidinas arrojó mejores resultados para las fusiones con el SBD<sub>tag</sub> al obtenerse fracciones más limpias de las proteínas de interés (Cap. 3, Fig. 3), demostrando la capacidad del sistema para ser empleado en la purificación de proteínas de fusión. Sin embargo, a pesar de que se recupera más proteína con la columna de  $\beta$ -ciclodextrina, este ligando puede llegar a ser costoso para realizar pruebas a mayor escala, por esta razón se llevaron a cabo pruebas de purificación utilizando los gránulos de almidón como matriz.

Previamente, en las pruebas de adsorción al gránulo de almidón de maíz, todas las proteínas de fusión diseñadas con el SBD<sub>tag</sub> habían demostrado su capacidad de adsorberse, lo que se vio comprobado al poder purificar a las fusiones empleando solo almidón (Cap. 3, Fig. 4) donde además se observó que la efectividad del sistema varía según el origen botánico del almidón. Esto es entendible ya que algunas propiedades físicas de los gránulos pueden variar dependiendo de la fuente vegetal de la cual provienen, como el tamaño de partícula o el contenido de amilosa/amilopectina [8] y estas características impactar en el porcentaje de recuperación o en la presencia de proteínas contaminantes, como se observó con el almidón de arroz, que tiene el menor tamaño de partícula (5  $\mu$ m) entre los almidones probados y presenta mayor tendencia a compactarse, lo que dificulta la suspensión de los gránulos al momento de lavar las proteínas no deseadas. Es probable que la realización de lavados adicionales hubiera tenido como consecuencia la eliminación de proteínas conaminantes durante la purificación, pero en un afán de comparación todos los almidones fueron lavados igual.

El SBD<sub>tag</sub> no solo es tan eficiente para purificar proteínas como otras etiquetas de afinidad, sino que al utilizar como soporte almidón resulta ser superior, ya que el sustrato tiene un precio muy bajo comparado con el resto de las resinas comercialmente disponibles y por tanto el costo de producción se abate en gran medida (Cap. 3, Tabla 3), lo que permite escalar el proceso sin que tenga un impacto económico importante.

Por otra parte, al inmovilizar proteínas sobre almidón no solo se puede utilizar a este polisacárido para la purificación de proteínas si no también como un soporte o vehículo de diversas proteínas de interés a las cuales se les fusione el SBD<sub>tag</sub> para permitir su adsorción al gránulo de almidón. Debido a las condiciones poco astringentes que se utilizan para que las proteínas se fijen, el gránulo de almidón resulta ser un soporte que presenta una resistencia adecuada tanto química como mecánica a las condiciones operacionales además que resulta ser fácilmente separable del medio líquido para recuperar las proteínas fijadas al soporte.

Las micropartículas de diversos biopolímeros se encuentran dentro de los soportes más estudiados sobre todo en el campo de administración de proteínas. No obstante, frecuentemente estos sistemas usan uniones químicas para anclar a las proteínas a su superficie además del uso de solventes durante la fabricación de las micropartículas que pueden llegar a afectar, por ejemplo, la actividad de una enzima o la inmunogenicidad de un antígeno. Al fijar proteínas al almidón a través del SBD<sub>tag</sub>, el proceso se simplifica y se evitan estas desventajas que pueden tener asociadas los sistemas microparticulados de polímeros. En cuanto a la forma de administración de estos sistemas, las micropartículas se han administrado tanto vía parenteral como oral siendo el campo más estudiado el de administración de antígenos para generar respuesta inmune contra distintos agentes infecciosos o alérgicos [68, 86].

Al tener necesidad de desarrollar más y mejores sistemas que puedan tener futuro uso en vacunas, cada vez se ha puesto mayor atención al uso de las micropartículas por vía oral, esto debido a las ventajas que esta ruta de administración presenta sobre la parenteral o subcutánea, por ejemplo, elimina la necesidad de agujas evitando así el riesgo de infecciones cruzadas, no causa dolor favoreciendo de esta manera la aceptación del paciente, no se necesita personal calificado para su administración, disminuye costos ya que no requiere de equipo y condiciones como lo necesitan las formulaciones inyectables, etc.

En esta tesis se administró por vía oral a ratones con gránulos de almidón que en su superficie tenían adsorbida la fusión TcSBD<sub>tag</sub>. Para que esta ruta de inmunización sea efectiva, primero el antígeno debe pasar por el tracto gastrointestinal sin ser degradado totalmente y segundo, las micropartículas cargadas con antígeno deben ser efectivamente capturadas por células especializadas en el transporte de partículas en el epitelio intestinal hacia cúmulos de tejido linfóide asociado a intestino donde se localizan células efectoras del sistema inmune.

Se sabe que la administración de antígenos en sustratos microparticulados aumenta su estabilidad durante su paso por el tracto gastrointestinal y favorece su captura y presentación [68]. Además, previamente se hicieron pruebas de estabilidad *in vitro* donde se observó que al inmovilizar fusiones entre antígenos y SBD<sub>tag</sub> al almidón se mejora su permanencia en fluidos simulados tanto gástrico como intestinal comparando con las fusiones sin inmovilizar [83].

La administración de TcSBD<sub>tag</sub> utilizando al almidón como vehículo tiene por objeto sensibilizar a los animales con el antígeno, de manera que desarrollen una respuesta humoral. Al comparar con la administración del antígeno sin ser inmovilizado se puede comprobar que el antígeno fijado al gránulo resiste en su paso por el estomago hasta llegar al intestino.

El almidón usado en este estudio es de arroz, el cual tiene un tamaño de partícula alrededor de 4 -5  $\mu\text{m}$ , por lo cual es un sustrato adecuado para ser utilizado como vehículo para la administración de antígenos, ya que las micropartículas hasta de 10  $\mu\text{m}$  son transportadas hasta el tejido linfoide asociado a intestino como las placas de Peyer, mientras que aquellas con un tamaño hasta de 5  $\mu\text{m}$  pueden ser transportadas a través de los vasos linfáticos hasta otros tejidos linfoides asociados a mucosas [89].

Dado que la respuesta inmune se puede ver afectada por factores como la naturaleza del vehículo, la dosis administrada, el tamaño de partícula o el esquema de administración entre otros tantos [84, 90], se probaron distintas dosis de la fusión TcSBD<sub>tag</sub> y dos diferentes esquemas de inmunización. De manera general se obtuvo como resultado que, el hecho de administrar la proteína de fusión inmovilizada al gránulo de almidón, favoreció la inducción de respuesta contra el antígeno comparando con la administración de proteína sin ser inmovilizada.

Es de resaltar, que contrario a lo que se ha reportado en otros estudios con micropartículas, en ningún protocolo de inmunización empleado en este trabajo se suministró algún potenciador de la respuesta inmune o adyuvante, esto con la finalidad de evitar un falso positivo en la inducción de anticuerpos y evaluar la viabilidad del sistema para actuar como vehículo o *per se* como adyuvante.

Analizando la respuesta que el sistema obtuvo con cada esquema de inmunización, se observó que al administrar refuerzos cada siete días, la respuesta más rápida en el tiempo (a los 15 días) fue la que se obtuvo con el grupo de animales que recibió 75  $\mu\text{g}$  de proteína adsorbida al almidón y al final del esquema fue la mejor respuesta. La dosis de 25  $\mu\text{g}$  de TcSBD<sub>tag</sub> adsorbida también fue favorecida en cuanto al tiempo y la producción de anticuerpos aunque al final del esquema la respuesta se igualó con la de los animales que recibieron 75  $\mu\text{g}$  de proteína que no estaba inmovilizada en almidón (Cap. 4, Fig. 3).

Cuando se cambió el esquema de inmunización a dosis repetidas con refuerzo cada veinte días, el grupo que recibió 25  $\mu\text{g}$  de TcSBD<sub>tag</sub> inmovilizada fue el que montó una mejor respuesta humoral, mientras que en el grupo inmunizado con 75  $\mu\text{g}$  de proteína inmovilizada no se presentó una buena respuesta (Cap. 5, Fig. 11), lo cual puede deberse a que al exponer al organismo a grandes dosis de antígeno por vía intragástrica, se pueda inducir tolerancia inmunológica [84], que previene el desarrollo de una respuesta en el tracto digestivo, por ejemplo en contra de la gran cantidad de moléculas presentes en los alimentos.

La efectividad del sistema para transportar antígenos hasta el intestino y favorecer la inducción de respuesta inmune no solo es debida a la protección conferida a TcSBD<sub>tag</sub> al ser inmovilizada, también al tamaño microparticulado y a la propiedad de mucoadhesión que tiene el almidón lo cual retarda el tiempo de eliminación en la mucosa intestinal y favorece su permanencia, aumentando la posibilidad de las micropartículas de ser captadas y transportadas [91].

Para corroborar si la respuesta inducida era protectora se administró a los animales, toxina del tétanos por vía subcutánea y se mantuvieron en observación. Los resultados mostraron que los animales inmunizados con TcSBD<sub>tag</sub> inmovilizada en almidón tardaron más tiempo en presentar síntomas e incluso con el segundo régimen de inmunización, el 20% de los ratones que recibió 25 µg de proteína adsorbida sobrevivió (Cap. 5, Fig. 12). Si bien en el modelo murino se produjeron anticuerpos dirigidos contra la toxina, no fueron suficientes o no fueron protectores. No obstante, aunque el porcentaje de supervivencia fue bajo, estos resultados son promisorios con respecto a la búsqueda de un adecuado sistema de presentación de antígenos y un esquema de administración adecuado, más tomando en cuenta que no se empleó ningún adyuvante como lo hacen otros sistemas empleados en generar respuesta protectora y que se administran por rutas mas inmunogénicas como la intramuscular o subcutánea [92, 93].

Finalmente, aunque existen diversos trabajos con el almidón como vehículo de antígenos o fármacos, en todos ellos presenta alguna modificación química para poder fabricar nano y micropartículas [6, 75, 76]. Hasta donde se ha investigado, no hay trabajos con el uso de gránulos de almidón naturales para transportar proteínas por lo que esta tesis sería el primer reporte, donde el sistema propuesto simplifica la manera en que un antígeno es inmovilizado y elimina el costo asociado a la fabricación de sustratos microparticulados. Además el almidón *per se* es no inmunogénico eliminando así la posibilidad de despertar alguna respuesta cruzada originada por el vehículo empleado.



## CONCLUSIONES

Se demostró la eficiencia del SBD<sub>tag</sub> para ser utilizado como dominio de afinidad y transferir la capacidad de adsorción al almidón insoluble a proteínas de fusión. El sistema permite purificar la proteína de fusión, a partir de una mezcla compleja, utilizando almidón y sus análogos como soporte.

En todos los casos probados los resultados de pureza fueron siempre mejores cuando la purificación se realizó con el sistema SBD<sub>tag</sub> contra un sistema comercial de afinidad a metal (His 6X). El sistema permitió la recuperación de hasta el 99% de la proteína CRSBD<sub>tag</sub>. En el caso de la fusión TcSBD<sub>tag</sub> la recuperación fue de entre 73 – 95 % (Cap 3. Tabla 2y Fig. 4).

La tecnología SBD<sub>tag</sub>-almidón ofrece al mercado una opción económica para la purificación de proteínas recombinantes disminuyendo el costo de purificación por mg de proteína de 11.5 dólares (His 6X) hasta <0.001 dólares (SBD<sub>tag</sub>).

La administración oral del antígeno inmovilizado favoreció la inducción de anticuerpos específicos contra el fragmento C de la toxina tetánica.

La respuesta obtenida es dependiente tanto del esquema de inmunización como de la dosis. Con las inmunizaciones en intervalos de 7 días se obtuvo una respuesta más temprana sin embargo con el esquema con dosis consecutivas, se obtuvo supervivencia frente al reto (20%).

## REFERENCIAS

- [1] Nakamura LK. *Lactobacillus amylovorus*, a New starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:56-63.
- [2] Santiago M, Linares L, Sánchez S, Rodríguez Sanoja R. Functional characteristics of the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase starch binding domain. *Biol Bratisl* 2005;60:111-14.
- [3] Rodríguez Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot JP. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha -amylase and role of the c-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3350-56.
- [4] Guillén D, Santiago M, Linares L, Perez R, Morlon J, Ruiz B, et al. Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3833-37.
- [5] Guillén D, Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Starch Granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr Polym* 2014;112:210-215.
- [6] Wikingsson LD, Sjöholm I. Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2002;20:3355-63.
- [7] Artursson P, Edman P, Laakso T, Sjöholm I. Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs. *J Pharm Sci* 1984;73:1507-13.
- [8] van der Maarel MJE, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotechnol* 2002;94:137-155.
- [9] Smith AM, Denyer K, Martin C. The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 1997;48:67-87.
- [10] Jenkins PJ, Cameron RE, Donald AM. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch* 1993;45:417-420.
- [11] Buléon A, Gallant DJ, Bouchet B, Mouille G, D'Hulst C, Kossmann J, et al. Starches from A to C (*Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal). *Plant Phys* 1997;115:949-957.
- [12] Imberty A, Perez S. A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers* 1988;27:1205-21.
- [13] Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant starch - a review. *Compr Rev Food Sci F* 2006;5:1-17.
- [14] MacGregor EA, Janeček Š, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *BBBA-Protein Struc Mol Enzymol* 2001;1546:1-20.
- [15] Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, et al. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature* 1975;255:609-614.
- [16] Jespersen HM, MacGregor EA, Sierks MR, Svensson B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem J* 1991;280:51-55.
- [17] Abe A, Tonozuka T, Sakano Y, Kamitori S. Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *J Mol Biol* 2004;335:811-822.
- [18] Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, Christensen S, Borchert TV, Beier L, et al. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic"  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochem* 1999;38:8385-8392.
- [19] Janeček Š, Svensson B, MacGregor E. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the  $\alpha$ -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur J Biochem* 2003;270:635-645.
- [20] Sorimachi K, Gal-Coëffet M-FL, Williamson G, Archer DB, Williamson MP. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to  $\beta$ -cyclodextrin. *Struc* 1997;5:647-661.
- [21] Giraud E, Brauman A, Keleke S, Lelong B, Raimbault M. Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991;36:379-383.
- [22] Morlon-Guyot J, Guyot JP, Pot B, De Haut IJ, Raimbault M. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1101-1109.
- [23] Nakamura LK, Crowell CD. *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentation. *Dev Ind Microbiol* 1979;20:532-540.
- [24] Pompeyo CC, Gómez MS, Gasparian S, Morlon-Guyot J. Comparison of amyolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;40:266-269.
- [25] Giraud E. Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. [Thèse]. Montpellier.: Université de Provence Aix-Marseille I; 1993.
- [26] Aguilar G, Morlon-Guyot J, Trejo-Aguilar B, Guyot JP. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>, an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb Tech* 2000;27:406-13.
- [27] Giraud E, Champailier A, Raimbault M. Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4319-4323.
- [28] Imam SH, Burgess-Cassler A, Cote GL, Gordon SH, Baker FL. A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight  $\alpha$ -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Current Microbiol* 1991;22:365-70.

- [29] Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Guyot J-P, Sanchez S. Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:297-302.
- [30] Morlon-Guyot J, Mucciolo-Roux F, Rodríguez Sanoja R, Guyot JP. Characterization of the *Lactobacillus manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. *DNA Seq* 2001;12:27-37.
- [31] Sumitani J-i, Tottori T, Kawaguchi T, Arai M. New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. no. 195  $\alpha$ -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochem J* 2000;350:477-84.
- [32] Boraston AB, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, van Bueren AL, Law V. A structural and functional analysis of alpha-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *J Biol Chem* 2006;281:587-98.
- [33] Candussio A, Schmid G, Böck A. Biochemical and genetic analysis of a maltopentaose-producing amylase from an alkaliphilic Gram-positive bacterium. *Eur J Biochem* 1990;191:177-85.
- [34] Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N, Sasaki T, Yamagata H, Tsukagoshi N, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for enzymatically active fragments of the *Bacillus polymyxa* beta-amylase. *J Bacteriol* 1987;169:1564-70.
- [35] Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D490-D95.
- [36] Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sánchez S. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009;36:341-46.
- [37] Cowan DA, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb Tech* 2011;49:326-46.
- [38] Pessela BCC, Mateo C, Filho M, Carrascosa A, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases. *Enzyme Microb Tech* 2007;40:242-48.
- [39] Purtov KV, Petunin AI, Burov AE, Puzyr AP, Bondar VS. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances. *Nanoscale Res Lett* 2010;5:631-636.
- [40] Wong LS, Khan F, Micklefield J. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem Rev* 2009;109:4025-53.
- [41] Butler JE. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods* 2000;22:4-23.
- [42] Gray JJ. The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:110-15.
- [43] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;60:523-533.
- [44] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001;293:2101-2105.
- [45] Thess A, Hutschenreiter S, Hofmann M, Tampé R, Baumeister W, Guckenberger R. Specific orientation and two-dimensional crystallization of the proteasome at metal-chelating lipid interfaces. *J Biol Chem* 2002;277:36321-28.
- [46] Sielaff I, Arnold A, Godin G, Tugulu S, Klok H-A, Johnsson K. Protein function microarrays based on self-immobilizing and self-labeling fusion proteins. *ChemBioChem* 2006;7:194-202.
- [47] Huber W, Perspicace S, Kohler J, Müller F, Schlatter D. SPR-based interaction studies with small molecular weight ligands using hAGT fusion proteins. *Anal Biochem* 2004;333:280-88.
- [48] Hengen PN. Purification of his-tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 1995;20:285-86.
- [49] Franken KL, Hiemstra HS, van Meijgaarden KE, Subronto Y, Den Hartigh J, Ottenhoff THM, et al. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Express Purif* 2000;18:95-99.
- [50] Steinhauer C, Wingren C, Khan F, He M, Taussig MJ, Borrebaeck CAK. Improved affinity coupling for antibody microarrays: Engineering of double-(his) 6-tagged single framework recombinant antibody fragments. *Proteomics* 2006;6:4227-34.
- [51] Khan F, He M, Taussig MJ. Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. *Anal Chem* 2006;78:3072-3079.
- [52] Hodneland CD, Lee Y-S, Min D-H, Mrksich M. Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5048-52.
- [53] Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* 2003;90:261-80.
- [54] Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Prog Polym Sci* 2000;25:1171-210.
- [55] Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm* 2008;363:26-39.
- [56] Bilati U, Allémann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano-and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;59:375-388.
- [57] Li X, Zhang Y, Yan R, Jia W, Yuan M, Deng X, et al. Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres. *J Control Release* 2000;68:41-52.
- [58] Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Dellacherie E, Vigneron C. Protein C-loaded monomethoxypoly (ethylene oxide)-poly (lactic acid) nanoparticles. *Int J Pharm* 2001;212:1-9.

- [59] Lu W, Park TG. Protein release from poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems. *PDA J Pharm Sci Technol* 1995;49:13-19.
- [60] Huang Y-Y, Chung T-W, Tzeng T-w. Drug release from PLA/PEG microparticulates. *Int J Pharm* 1997;156:9-15.
- [61] Ryan EJ, Daly LM, Mills KHG. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *TRENDS Biotechnol* 2001;19:293-304.
- [62] O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant - "The long and winding road". *Drug Discov Today* 2009;14:541-51.
- [63] Cogne M, Ballet JJ, Schmitt C, Bizzini B. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum adsorbed and nonadsorbed tetanus toxoid in humans. *Ann Allergy* 1985;54:148-51.
- [64] Mark A, Björkstén B, Granström M. Immunoglobulin E responses to diphtheria and tetanus toxoids after booster with aluminium-adsorbed and fluid DT-vaccines. *Vaccine* 1995;13:669-673.
- [65] Abd El Ghany M, Jansen A, Clare S, Hall L, Pickard D, Kingsley RA, et al. Candidate live, attenuated salmonella enterica serotype typhimurium vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infect Immun* 2007;75:1835-1842.
- [66] Reveneau N, Geoffroy M-C, Loch C, Chagnaud P, Mercenier A. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 2002;20:1769-1777.
- [67] Andrianov AK, Payne LG. Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. *Adv Drug Deliver Rev* 1998;34:155-70.
- [68] O'Hagan DT. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv Drug Deliver Rev* 1998;34:305-20.
- [69] Kumari K, Rani U. Controlled release of metformin hydrochloride through crosslinked blends of chitosan-starch. *Adv Appl Sci Res* 2011;2:48-54.
- [70] Balmayor ER, Tuzlakoglu K, Azevedo HS, Reis RL. Preparation and characterization of starch-poly- $\epsilon$ -caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2009;5:1035-45.
- [71] Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P, Shapiro IM, Reis RL. Starch-based microparticles as vehicles for the delivery of active platelet-derived growth factor. *Tissue Eng* 2007;13:1259-68.
- [72] Heritage PL, Loomes LM, Jianxiong J, Brook MA, Underdown BJ, McDermott MR. Novel polymer-grafted starch microparticles for mucosal delivery of vaccines. *Immunology* 1996;88:162-68.
- [73] Pareta R, Edirisinghe MJ. A novel method for the preparation of biodegradable microspheres for protein drug delivery. *J Roy Soc Interface* 2006;3:573-82.
- [74] Liu C-S, Desai KGH, Meng X-H, Chen X-G. Sweet potato starch microparticles as controlled drug release carriers: Preparation and in vitro drug release. *Dry Technol* 2007;25:689-93.
- [75] Rodrigues A, Emeje M. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydr Polym* 2012;87:987-94.
- [76] Heritage PL, Underdown BJ, Brook MA, McDermott MR. Oral administration of polymer-grafted starch microparticles activates gut-associated lymphocytes and primes mice for a subsequent systemic antigen challenge. *Vaccine* 1998;16:2010-17.
- [77] Fang T-Y, Lin L-L, Hsu W-H. Recovery of isoamylase from *Pseudomonas amyloclavata* by adsorption-elution on raw starch. *Enzyme Microb Tech* 1994;16:247-52.
- [78] Lin LL, Lo HF, Chen JN, Ku KL, Hsu WH. Isolation of a recombinant *Bacillus* sp. TS-23  $\alpha$ -amylase by adsorption-elution on raw starch. *Starch-Stärke* 2002;54:338-3342.
- [79] Huang H-B, Chi M-C, Hsu W-H, Liang W-C, Lin L-L. Construction and one-step purification of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase fused to the starch-binding domain of *Bacillus* sp. strain TS-23  $\alpha$ -amylase. *Bioproc Biosyst Eng* 2005;27:389-398.
- [80] Chen L, Ford C, Kusnadi A, Nikolov ZL. Improved adsorption to starch of a  $\beta$ -galactosidase fusion protein containing the starch-binding domain from *Aspergillus Glucoamylase*. *Biotechnol Prog* 1991;7:225-229.
- [81] Dalmia BK, Schütte K, Nikolov ZL. Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: An independent starch-binding domain. *Biotechnol Bioeng* 1995;47:575-584.
- [82] Lin S-C, Lin I, Chou W-I, Hsieh C-A, Liu S-H, Huang R-Y, et al. CBM21 starch-binding domain: A new purification tag for recombinant protein engineering. *Protein Expres Purif* 2009;65:261-66.
- [83] Moreno-Mendieta S, Guillén D, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Gastrointestinal stability of proteins immobilized on raw starch microparticles.
- [84] Schunk MK, Macallum GE. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR J* 2005;46:241-57.
- [85] Reid BG, Flynn GC. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 1997;36:6786-6791.
- [86] Rajapaksa TE, Lo DD. Microencapsulation of vaccine antigens and adjuvants for mucosal targeting. *Curr Immunol Rev* 2010;6:29-37.
- [87] Coucke D, Schotsaert M, Libert C, Pringels E, Vervaeke C, Foreman P, et al. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly (acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 2009;27:1279-1286.
- [88] Externest D, Meckelein B, Schmidt MA, Frey A. Correlations between antibody immune responses at different mucosal effector sites are controlled by antigen type and dosage. *Infect Immun* 2000;68:3830-3839.

- [89] Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches. *J Control Release* 1990;11:205-214.
- [90] Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int J Pharm* 2002;245:109-121.
- [91] Saraswathi B, Balaji A, Umashankar MS. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:423-430.
- [92] Charles IG, Rodgers BC, Makoff AJ, Chatfield SN, Slater DE, Fairweather NF. Synthesis of tetanus toxin fragment C in insect cells by use of a baculovirus expression system. *Infect Immun* 1991;59:1627-1632.
- [93] Fairweather NF, Lyness VA, Maskell DJ. Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987;55:2541-2545.