



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD ALCOHOLÍTICA DE LA α -AMILASA AmyA
DE *Thermotoga maritima*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

RODRIGO ALEJANDRO ARREOLA BARROSO

DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Comité tutor:
DRA. MARCELA AYALA ACEVES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM
DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MOR. 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.

La presente tesis se desarrolló en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la asesoría de la Dra. Gloria Saab Rincón. El proyecto fue parcialmente financiado por CONACyT 0154194/Dra. Gloria Saab Rincón y PAPIIT IN206311/Dra. Gloria Saab Rincón. Además se tuvo acceso a la supercomputadora Miztli mediante el proyecto de la Coordinación de Supercómputo 2014-1-93/Dra. Marcela Ayala Aceves. Rodrigo Alejandro Arreola Barroso tuvo financiamiento de CONACyT mediante una beca Posgrado PNP y otra a través del proyecto CB 0154194 (Número de registro 443241).

Agradezco a:

La Dra. Gloria Saab Rincón por su apoyo incondicional y gran confianza, dentro y fuera del laboratorio; así como por extraordinario compromiso, sus consejos y comentarios que siempre permitieron seguir adelante este proyecto.

Mi comité tutor, integrado por la Dra. Marcela Ayala Aceves y el Dr. Agustín López Munguía Canales, por compartir su experiencia y ayudar al crecimiento de este proyecto mediante sus comentarios y críticas.

Mi comité sinodal, constituido por la Dra. Romina Rodríguez, la Dra. Claudia Martínez, la Dra. Claudia Rodríguez, el Dr. Alfredo Martínez y el Dr. Daniel Segura, por leer y corregir mi manuscrito buscando siempre su mejora.

El Dr. Humberto Flores Soto, la Ing. Leticia Olvera Rodríguez y M. en C. Edson Norberto Carcamo Noriega por su gran disposición y generosa ayuda en la práctica de la Biología Molecular. Gracias por escuchar, comentar y compartir y ser un ejemplo a seguir dentro y fuera del laboratorio.

El Biól. Filiberto Sanchez Lopez por asesorarme durante mis primeras incursiones en Biología Molecular.

El T.L. Fernando Gonzalez Muñoz por su valiosa asesoría y supervisión durante el montaje y realización de todos los experimentos de cromatografía de líquidos que permitieron la cuantificación de los productos de alcoholisis. Así como por compartir su experiencia dentro y fuera del laboratorio.

El laboratorista Javier Dorantes Lopez por su disposición para preparar medios de cultivo y esterilizar material, reduciendo así el tiempo de los experimentos.

La laboratorista Aurelia Ocampo Vargas por la preparación de reactivos indispensables para el análisis de azúcares reductores y placas de cromatografía de placa fina usados en esta tesis. Gracias también por las comidas y el cariño.

La Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN por sus servicios en la secuenciación de genes que permitieron identificar los cambios en las mutantes creadas.

La Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos por el financiamiento proporcionado para asistir al “3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function; Cuarto Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas” y a “Protein Society Meeting 2014 (The 28th Annual Symposium of the Protein Society)”. Así como por su constante ayuda en trámites académicos y administrativos, siempre con la mejor disposición.

A mis padres Lucio Arreola González y Guadalupe Barroso Paredes por haber sido siempre un gran ejemplo y apoyo en mi vida.

A mis hermanos Lucio y Adriana por haber compartido conmigo tantos años y experiencias.

A Mauricio Ortiz Gutiérrez por el tiempo compartido y su complicidad y apoyo durante momentos de alegría o de dificultad.

A mi familia por su cariño y apoyo, que me acompañan a donde quiera que voy.

A mis tíos Juan, Zoila, Cristi, Cuca, Susana, Gaby y Pepé, por ser mi familia que trasciende lazos de sangre.

A Aurora, Cintia, Roxana, Ady, Ricardo, Gaby, Daniela Alejandra, Gringo, Ana, Jenny por su amistad de tantos años por separado o en conjunto.

A mis químicos: Sofía, Diana, Arturo, Maru, Diego, Rogelio, Inés y Rosita por su gran cariño y apoyo a pesar del tiempo y la distancia.

A Jorge por ser un amigo fiel y entusiasta, que siempre encuentra comprensión y cariño para los demás.

A Silvia, Bono, Alejandra, Eli, César, Piotr, Lesli, Marisol (China), Miguel Ángel por los muchos años de amistad

A mis amigos y compañeros de laboratorio Getza, Emma, Tatiana, Caro, Yossef, Edson, Niño (Israel), Simon, Diego, Miriam, Fanny, Brenda, Italia, Humberto, Joel, Katy, Vero, Sonia, Juanita, los Emanueles, Beto, Paloma, Mary, Lety, Fili, Anita (Chamu), Ricardo, Valeria, Yara por estar ahí para dar retroalimentación, consejos, oír problemas y compartir tantas experiencias extracurriculares.

A mis amigos Nuria, Ramces, Rodrigo (Ibarra), Carmen, Felipe, Jaz, Remi, Esteban, Pancho, Gustavo, Armando (Aca), Adam, Joaquín, Grecia, Arlen, Alejandra, los Agustines y los Rudis, por enriquecer mi experiencia en el IBt, sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos Quitzé y Mariana (Masha) que han estado presentes en muchas etapas importantes de mi vida.

A Rodrigo (Lezama), Dafne, Kelly, Marco y Qian que siempre me mandan buenas vibras desde lejos.

A mis caseros Luzma y Miguel por la confianza, cariño y convivencias, que hicieron más agradable mi estancia en Cuernavaca.

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------------------|--------------------------------------------------|
| 2M2B | 2-metil-2-butanol |
| 2M2P | 2-metil-2-propanol |
| A/H | Cociente de productos alcoholisis/hidrólisis |
| <i>A. niger</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>A. oryzae</i> | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| <i>B. licheniformis</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| BuOH | butanol |
| <i>B. stearothermophilus</i> | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| dATP | desoxiadenosina trifosfato |
| dCTP | desoxicitidina trifosfato |
| dGTP | desoxiguanosina trifosfato |
| DMF | dimetilformamida |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNS | ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| dTTP | desoxitimidina trifosfato |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| FPLC | Fast Performance Liquid Chromatography |
| GTasa | glicosiltransferasa |
| IPTG | isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| LB | Luria-Bertani |
| min | minutos |
| MeCN | acetonitrilo |
| PEG1000 | polietilenglicol con masa molecular de 1 000 Da |
| PEG10000 | polietilenglicol con masa molecular de 10 000 Da |
| t | tiempo |
| <i>T. maritima</i> | <i>Thermotoga maritima</i> |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometano |

Tabla de contenido

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Abstract | 9 |
| 2. Resumen..... | 11 |
| 3. Introducción | 13 |
| 3.1 ALQUIL GLICÓSIDOS | 13 |
| 3.1.1 Síntesis química..... | 13 |
| 3.1.2 Síntesis enzimática | 14 |
| 3.1.2.1 Glicosiltransferasas | 15 |
| 3.1.2.2 α -amilasas | 15 |
| 3.2 α -AMILASAS | 17 |
| 3.2.1 Clasificación..... | 17 |
| 3.2.2 Mecanismo de reacción | 17 |
| 3.2.3 Elementos estructurales..... | 18 |
| 3.2.4 Sustrato | 21 |
| 3.2.5 Actividad alcoholítica de α -amilasas..... | 22 |
| 3.2.6 α -amilasas en <i>Thermotoga maritima</i> MSB8 | 24 |
| 4. Antecedentes | 26 |
| 4.1 ACTIVIDAD ALCOHOLÍTICA DE AmyA DE <i>Thermotoga maritima</i> | 26 |
| 4.1.1 Incremento de la actividad alcoholítica de AmyA de <i>Thermotoga maritima</i> | 26 |
| 4.1.2 Efecto de la composición del disolvente en la actividad alcoholítica de α -amilasas..... | 28 |
| 4.2 EFECTO DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN OTRAS ENZIMAS | 29 |
| 4.2.1 Efecto en la estabilidad de las enzimas..... | 29 |
| 4.2.2 Efecto en la especificidad enzimática | 34 |
| 4.3 ESTABILIDAD DE LAS α -AMILASAS EN UNA MEZCLA ALCOHOL-AGUA..... | 35 |
| 4.4 EVOLUCIÓN DIRIGIDA | 36 |
| 5. Hipótesis..... | 38 |
| 6. Objetivo General | 38 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. Objetivos particulares | 38 |
| 8. Estrategia para incrementar el contenido de alcohol en el medio de reacción manteniendo a AmyA activa..... | 39 |
| 8.1 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 39 |
| 8.1.1 Producción y purificación de la enzima silvestre AmyA de <i>Thermotoga marítima</i> | 39 |
| 8.1.2 Medición de la actividad de AmyA en mezclas de disolventes | 40 |
| 8.1.2.1 Preparación de las muestras | 40 |
| 8.1.2.2 Reacción enzimática..... | 40 |
| 8.1.2.3 Medición de los productos totales de hidrólisis de almidón | 41 |
| 8.1.2.4 Medición de productos totales de alcoholólisis..... | 41 |
| 8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 42 |
| 8.2.1 Efecto de la Concentración de Butanol sobre la reacción de butanolólisis | 42 |
| 8.2.2 Determinación del tiempo óptimo de reacción para producción de butilglucósidos..... | 44 |
| 8.2.3 Uso de cosolventes en la mezcla de reacción. | 46 |
| 8.2.4 Efecto de concentración de butanol sobre las reacciones de alcoholólisis en presencia de cosolventes | 50 |
| 9. Evolución dirigida para aumentar la estabilidad de AmyA de <i>Thermotoga marítima</i> a alcoholes | 54 |
| 9.1 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 54 |
| 9.1.1 Generación de un banco de mutantes de AmyA de <i>Thermotoga marítima</i> | 54 |
| 9.1.2 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en mezclas acuosas de butanol-acetonitrilo en la actividad hidrolítica de AmyA | 55 |
| 9.1.2.1 Determinación del diagrama de fases de la mezcla butanol-agua-acetonitrilo a temperatura ambiente | 55 |
| 9.1.2.2 Producción de AmyA para los ensayos catalíticos del perfil de estabilidad..... | 55 |
| 9.1.2.3 Efecto de la concentración de butanol en la estabilidad de AmyA ... | 56 |
| 9.1.2.4 Evaluación de la relevancia de preincubar a AmyA en la mezcla de reacción antes de agregar el sustrato. | 56 |
| 9.1.2.5 Efecto sobre AmyA de la concentración de butanol entre 10 y 15% | 57 |
| 9.1.3 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en medio sólido con butanol-acetonitrilo en la actividad amilolítica de AmyA..... | 57 |
| 9.1.3.1 Actividad amilolítica de AmyA en medio sólido | 57 |
| 9.1.3.2 Relación del efecto de la composición de butanol y acetonitrilo en medio sólido con el de la mezcla acuosa..... | 58 |
| 9.1.4 Estandarización de la producción heteróloga de la enzima AmyA en cajas de pozos | 59 |
| 9.1.4.1 Método de producción de enzima | 59 |
| 9.1.4.2 Medición de la actividad catalítica..... | 59 |
| 9.1.5 Cribado del banco de mutantes | 60 |

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.2 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 61 |
| 9.2.1 | Generación de un banco de mutantes de AmyA de <i>Thermotoga maritima</i> | 62 |
| 9.2.2 | Evaluación del impacto de la concentración de butanol en mezclas acuosas de butanol-acetonitrilo en la actividad hidrolítica de AmyA | 63 |
| 9.2.2.1 | Determinación del diagrama de fases de la mezcla butanol-agua-acetonitrilo a temperatura ambiente | 63 |
| 9.2.2.2 | Efecto de la concentración de butanol en la estabilidad de AmyA ... | 64 |
| 9.2.2.3 | Evaluación de la relevancia de preincubar a AmyA en la mezcla de reacción antes de agregar el sustrato. | 64 |
| 9.2.2.4 | Efecto sobre AmyA de la concentración de butanol entre 10 y 15% | 65 |
| 9.2.3 | Evaluación del impacto de la concentración de butanol en medio sólido con butanol-acetonitrilo en la actividad amilolítica de AmyA | 66 |
| 9.2.3.1 | Actividad amilolítica de AmyA en medio sólido | 66 |
| 9.2.3.2 | Relación del efecto de la composición de butanol y acetonitrilo en medio sólido con el de la mezcla acuosa | 67 |
| 9.2.4 | Estandarización de la producción heteróloga de la enzima AmyA en cajas de 96 pozos | 68 |
| 9.2.4.1 | Método de producción de enzima | 69 |
| 9.2.5 | Cribado del banco de mutantes | 71 |
| 10. | Conclusiones | 74 |
| 11. | Perspectivas | 74 |
| 12. | Referencias..... | 75 |
| 13 | Anexo I Mapa de construcción pET22/AmyA sin péptido líder y con etiqueta de histidinas construido por Damián Almazo, J.Y. (2006) | 79 |
| 14 | Anexo II La α -amilasa AmyA de <i>T. marítima</i> no corta el enlace O-glucosídico del butil glucósido. | 81 |
| 15 | Anexo III Mapa de construcción pET22/AmyA con péptido líder pelB creado por Damián Almazo, J.Y. (2006) | 82 |

1. Abstract

Surfactants are molecules with a polar and a non-polar segment, which maintain oleous components mixed with aqueous solutions in one phase. In particular, alkyl-glycosides are frequently used as surfactants in pharmaceutical, food and cosmetic industries due to their low toxicity and high stability. However their generation by traditional chemical methods implies a complicated synthesis comprising several protection-deprotection steps of the hydroxyl groups in the glycoside which affect the product yield, and require solvents and reagents non amenable to the environment. An alternative for their production is through enzymatic reactions which are advantageous due to their stereo, enantio and regioselectivities. Among the enzymes that can synthesize alkyl-glycosides are the glycosyl-transferases and some α -amylases. The latter have the advantage of using an abundant and inexpensive substrate, starch, in contrast to other transferases that require very expensive activated donors. In our group, several α -amylases have been characterized to carry out alcoholysis reactions. To this day, when comparing *Thermotoga maritima* enzyme AmyA to other α -amilases used for the alcoholysis reaction, AmyA: produces the highest quantity of alcoholysis products with methanol, sole aliphatic alcohol explored with all α -amylases; has the highest optimal temperature for catalysis of the group; and continues to be active for the alcoholysis reaction at methanol concentrations 10% higher than the rest of this enzymes. Its ability to perform the alcoholysis reaction has been improved through some amino acid substitution on its sequence, which led to a transglycosidic activity increase for this enzyme. However its application is still limited by the low solubility of long chain alcohols in aqueous media and by the low stability of the enzyme in organic solvents. In the present work, the problem impose by the limited substrate solubility was undertaken by the addition of cosolvents in order to increase the concentration of butanol in the reaction medium while maintaining a single phase. A systematic study of

the effect of different cosolvents on the quantity of butyl glycosides produced and specificity of the reaction was carried out. DMSO turned out to be the best cosolvent for the reaction, with an increase of 24% in the production of butyl glycosides, but more importantly, triplicating selectivity towards alcoholysis versus hydrolysis reaction, reaching a selectivity factor close to one. These results set a precedent for the use of long chain alcohols whose reactivity is limited by their low or no solubility in water. By using DMSO at a molar fraction of 0.052, it was possible to surpass the concentration of 9.75% at which butanol is no longer soluble, and reach a concentration beyond 12%, after which we observed a decrease in the concentration of alcoholysis; most likely due to enzyme loss of structure. A second objective thus, is to increase the stability of the enzyme towards alcohols. There are not obvious rules to design enzymes to stand organic environments while keeping activity, therefore, directed evolution arise as a good option to approach this problem. Although in this work it was not possible to find a mutant with increased activity in organic solvents, a methodology was set up to screen for stability towards alcohols. This methodology sets the basis for future experiments in which libraries generated by error-prone PCR will be sieved to identify mutations that contribute to the stability of the protein towards alcohols while it remains active.

2. Resumen

Los surfactantes son moléculas con un segmento polar y otro no polar que mantienen a las mezclas acuosas con componentes lipídicos en una sola fase. En particular, los alquil glicósidos son usados frecuentemente como surfactantes en las industrias farmacéuticas, alimentarias y cosméticas debido a su baja toxicidad y gran estabilidad. Sin embargo, su producción a través de métodos químicos tradicionales conlleva una síntesis complicada con muchos pasos de protección-desprotección de los grupos hidroxilo en el glicósido, lo que afecta el rendimiento del producto final, y además requieren disolventes y reactivos agresivos con el medio ambiente. Una alternativa para su producción son las reacciones enzimáticas, que tienen como ventaja su estereo, enantio y regioselectividad. Entre las enzimas que pueden sintetizar los alquil glicósidos existen las glicosil-transferasas y algunas α -amilasas. Estas últimas tienen como ventaja el usar como sustrato el almidón, que es abundante y barato, lo que contrasta con otras transferasas que requieren donadores activados muy costosos. En nuestro grupo, hemos caracterizado varias α -amilasas para llevar a cabo la reacción de alcoholólisis. A la fecha, cuando comparamos a AmyA de *Thermotoga maritima* con el resto las α -amilasas exploradas para esta reacción, AmyA: produce la mayor cantidad productos de alcoholólisis con metanol, único alcohol alifático explorado con todas las α -amilasas; presenta la temperatura óptima de catálisis más alta entre éstas y continúa siendo activa para la reacción de alcoholólisis después de alcanzar una concentración 10% más alta que la que toleran las otras enzimas. Adicionalmente, su capacidad para la reacción de alcoholólisis ha sido mejorada a través de sustituciones en algunos aminoácidos, las cuales incrementaron tanto su actividad transglicosídica como alcoholítica. Sin embargo, la pobre solubilidad de alcoholes de cadena larga en soluciones acuosas y la estabilidad de la enzima en disolventes orgánicos limitan la aplicación de esta enzima. En el presente trabajo, el problema de solubilidad de alcoholes fue abordado mediante la adición de cosolventes para incrementar la solubilidad de butanol en el medio de reacción, manteniendo una sola fase. Se realizó un estudio

sistemático del efecto de diferentes cosolventes en la cantidad de butil glicósidos producidos y especificidad de la reacción. El DMSO resultó el mejor cosolvente para la reacción con un incremento del 24% en la producción de alquil glucósidos, pero más sobresaliente fue el aumento en la selectividad de la reacción hacia la alcoholólisis frente a la hidrólisis, que se triplicó, alcanzando un valor cercano a uno. Estos resultados crean un precedente para el uso de alcoholes de cadena larga cuya reactividad está limitada por baja o nula solubilidad en agua. Mediante el uso de DMSO, fue posible incrementar la concentración de butanol en el medio, manteniendo una sola fase, más allá de una concentración de 9.75% de butanol, superando así el límite impuesto por la solubilidad del alcohol y alcanzando concentraciones mayores a 12%, concentración después de la cual deja de aumentar la producción de alcoholólisis en la mezcla final de reacción con la adición de más butanol y comienza a observarse una menor concentración de butil glucósidos, probablemente debido a la pérdida de estructura de la enzima. Por ello, un segundo objetivo fue incrementar la estabilidad de la enzima hacia los alcoholes. No hay reglas evidentes para diseñar enzimas que toleren medios orgánicos, manteniendo su actividad, por lo que la evolución dirigida parece una buena estrategia para abordar este problema. Aunque en el presente trabajo, no fue posible encontrar mutantes más activos en disolventes orgánicos, se implementó una metodología para seleccionar estabilidad frente alcoholes. Esta metodología sienta las bases para futuros experimentos en los que librerías generadas mediante PCR con propensión a errores serán analizadas para identificar mutaciones que contribuyan a la estabilidad de las proteínas frente alcoholes, mientras se mantienen activas.

3. Introducción

3.1 ALQUIL GLICÓSIDOS

Los alquil glicósidos son moléculas anfipáticas usadas como detergentes, espumantes, humectantes, emulsificantes, fluidizantes, antimicrobianos (Baltzer, D., 1991; Matsumura, S. et al., 1990); así como materia prima para la síntesis de glicosil ésteres de ácidos grasos (Mutua, L.N.,1993). Además, han despertado gran interés en la solubilización de proteínas de membrana (Rosevear, P., et al., 1980; Privé, G.G., 2007). Esta gama de aplicaciones es posible gracias a que sus propiedades pueden ser moduladas a través de la sustitución de su segmento glicona, constituido por un mono u oligosacárido, o su extremo aglicón, conformado por un grupo alquilo; unidos a través de un enlace O-glicosídico.

La versatilidad descrita arriba, su baja toxicidad (Fiume, M.M., 2013) y alta estabilidad en un amplio rango de pH (Geetha, D., 2012) hacen a estas moléculas surfactantes interesantes para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria.

3.1.1 Síntesis química

Los alquil glicósidos se forman al sustituir el grupo hidroxilo unido al carbono anomérico de un glicósido por uno alcohólico, el cual puede formar un enlace con configuración anomérica α o β (**Figura 1**).

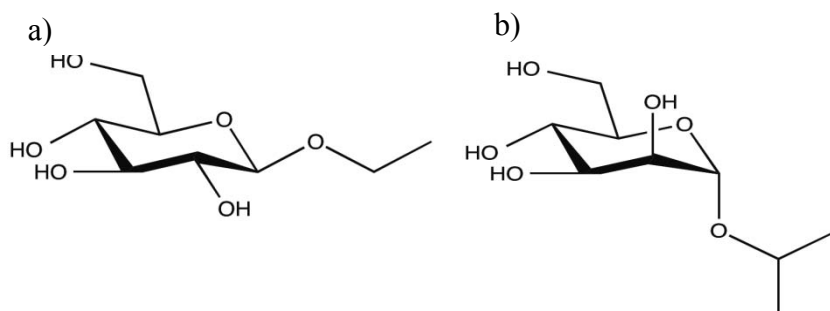


Figura 1. Los alquil glicósidos se nombran escribiendo primero el nombre del grupo alquilo del que proviene el alcohol, seguido del nombre del azúcar con el sufijo -ósido.
Estructuras de alquil glicósidos:
a) β -etil glucósido;
b) α -isopropil manósido.

Para realizar esta sustitución se ha recurrido tradicionalmente a la reacción de glicosilación de Fischer (Roy, B., Mukhopadhyay, B., 2007) o la activación estereoselectiva del carbono anomérico del azúcar (Demchemko, A.V., 2008).

En el primero de estos métodos, se usa metil glicósido como materia prima. Éste se obtiene disolviendo el glicósido deseado en metanol en presencia de un ácido inorgánico, que generalmente es ácido clorhídrico, el cual cataliza la sustitución del hidroxilo anomérico por un grupo metóxido. Posteriormente, este metil glicósido, se disuelve en el alcohol correspondiente al grupo aglicón que se busca introducir. La sustitución de un alcohol por el otro es mediada, de nuevo, por un ácido inorgánico, que actúa como catalizador. Tanto en la síntesis del metil glicósido como del alquil glicósido por este método existen algunas desventajas. La falta de selectividad de la reacción produce mezclas de piranósidos (anillos de 6 miembros) y furanósidos (anillos de 5 miembros), así como la mezcla de los isómeros α y β , cuya composición es determinada por efectos cinéticos y termodinámicos. La necesidad de usar un exceso del alcohol impide su aplicación para alcoholes de alto costo. Así mismo, la temperatura requerida para que se realice la reacción aumenta con la longitud de la cadena del alcohol. Finalmente, la corrosividad de los ácidos inorgánicos crea problemas de manejo de la reacción.

El problema de selectividad al que se enfrenta la glicosilación de Fischer puede resolverse mediante la activación estereoselectiva del carbono anomérico del azúcar. Sin embargo, la similitud en la reactividad de los grupos hidroxilo del glicósido requiere de su protección y posterior desprotección (**Figura 2**), con la consecuente merma en el rendimiento del producto deseado (Mahon, E., *et al.*, 2010).

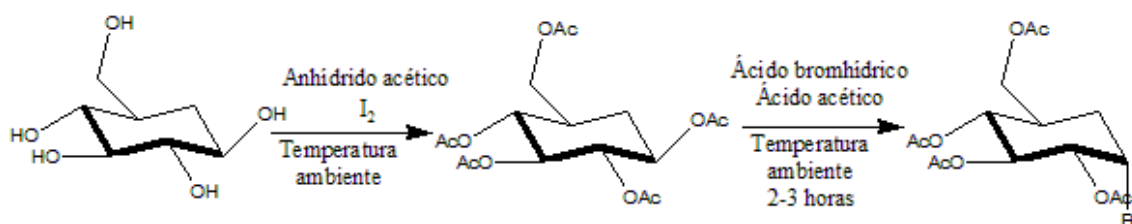


Figura 2. Reacciones para activar regio y estereoselectivamente al carbono anomérico de la glucosa para producir un alquil glicósido β -anomérico. Reacción empleada por Mahon, E., *et al.*, 2010.

3.1.2 Síntesis enzimática

Una alternativa a estos procesos químicos, más compatible con la necesidad actual de generar menos contaminantes en los procesos industriales es el uso de enzimas regio y enantioselectivas, previniendo la producción de subproductos derivados de reacciones adicionales en la síntesis química y el uso de reactivos poco amigables con el

ambiente.

3.1.2.1 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas (GTasas, EC 2.4.X.Y) son enzimas que transfieren un grupo glicósido activado con un nucleótido a una molécula aceptora con gran especificidad y estereoselectividad. Para que la transferencia ocurra, el glicósido debe estar unido a través de su carbono anomérico con un nucleótido, que facilite la ruptura del enlace O-glucosídico (Leloir, L.F., 1971). La activación de los sustratos de estas enzimas puede realizarse mediante GDP, UDP, CMP; sin embargo, cada enzima particular reconoce sólo un nucleótido activando su sustrato, y el cambio en el nucleótido es poco tolerado (Schmaltz, R.M., *et al.*, 2011). Otras limitantes en la aplicación de estas enzimas son la presencia de un dominio de unión a membrana que muchas GTasas poseen (Breton, C., *et al.*, 2012); así como la inhibición presentada por los nucleótidos difosfatos producidos durante la reacción, lo que hace necesario el uso de enzimas adicionales para eliminarlos (Ichikawa, Y., *et al.*, 1994).

3.1.2.2 α -amilasas

La síntesis de alquil glicósidos se puede llevar a cabo mediante la reacción de alcoholólisis enzimática a partir de almidón en un sólo paso.

Las α -amilasas son enzimas capaces de degradar el almidón, que es el polímero de reserva más abundante en plantas. Se ha observado que en presencia de alcoholes algunas de estas enzimas pueden realizar la reacción de alcoholólisis, dando como productos alquil glicósidos.

En nuestro grupo de investigación, se ha estudiado la reacción de alcoholólisis utilizando distintas α -amilasas (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a). Entre las α -amilasas que han explorado sobresale la enzima AmyA del organismo hipertermófilo *Thermotoga maritima*, que presenta la mayor actividad alcoholítica (Moreno, A., *et al.*, 2010). La experiencia de nuestro grupo señala que un factor importante para la reacción de alcoholólisis es que la enzima tenga una significativa actividad transglicosídica, propiedad con la que cuenta la enzima de *Thermotoga maritima*. Otra ventaja que ésta presenta sobre las enzimas de *Aspergillus oryzae* (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a), *B. stearothermophilus* (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999b) y *B. licheniformis* (Rivera, M.H., 2004) estudiadas anteriormente, es su mayor estabilidad. Esta estabilidad frente a la

temperatura, también se ve reflejada en su estabilidad frente a disolventes orgánicos (Tabla 1), un factor ventajoso considerando que uno de los sustratos es un alcohol. De hecho se ha observado la cantidad de alcohol en el medio es un factor que controla el rendimiento de la reacción de alcoholólisis tanto para AmyA (Moreno, A., *et al.*, 2010) como para las otras amilasas estudiadas (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a; Larsson, J., *et al.*, 2005). Al ser AmyA más estable en presencia de metanol, se logran mayores rendimientos que con las otras amilasas estudiadas hasta la fecha (Moreno, A., *et al.*, 2010).

Tabla 1. Temperatura óptima y concentración tolerada de metanol en presencia de almidón de las α -amilasas con actividad alcoholítica en metanol.

| Organismo | Temperatura óptima de catálisis | Concentración tolerada de metanol con almidón para la reacción de alcoholólisis |
|--------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>T. maritima</i> | 85 °C (Liebl, <i>et al.</i> , 1997) | 40% (Moreno, A., <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>A. niger</i> | 70 °C (Uguru, G.C., <i>et al.</i> , 1997) | 30% (Santamaria, R.I., <i>et al.</i> , 1999a) |
| <i>A. oryzae</i> | 25-35 °C (Jin, B., <i>et al.</i> , 1998) | 30% (Larsson, J., <i>et al.</i> , 2005) |

Hasta ahora, los estudios sistemáticos de las reacciones de alcoholólisis se han limitado al uso de metanol y a la concentración máxima que se puede alcanzar de butanol en una solución amortiguadora acuosa (9.75%). Aunque es deseable realizar la reacción con alcoholes de cadena más larga al butanol, éstos son insolubles en agua lo que limita la cantidad de alcohol disponible para la reacción cuando se trabaja en un sistema de una sola fase. Por otro lado, la estabilidad de la enzima a altas concentraciones de alcohol es un factor que también compromete su actividad. Por esta razón, en el presente trabajo se propuso abordar estos dos problemas: por un lado implementar estrategias que permitieran incrementar la concentración de alcoholes de cadena larga en el medio de reacción, y por otro lado, incrementar la estabilidad de la proteína a altas concentraciones de alcohol. El alcohol que se utilizó como modelo es el butanol cuya solubilidad en agua es 9.75%, ya que, que es un alcohol con límite de solubilidad en agua para el que se contaba con el alquil glucósido respectivo, estándar necesario para la cuantificación de los alquil glicósidos totales producidos mediante alcoholólisis.

El uso de cosolventes es una estrategia que se ha utilizado para incrementar la miscibilidad de componentes orgánicos en mezclas acuosas (Klibanov, A.M., 2001). Los cosolventes más comúnmente utilizados para incrementar la solubilidad de los

sustratos insolubles en agua, manteniendo una sola fase son alcoholes, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (Carrea, G., 2000), entre otros.

3.2 α -AMILASAS

3.2.1 Clasificación

Entre el grupo de las glicosil hidrolasas, la familia 13 (GH13) contiene a casi la totalidad de las enzimas que actúan sobre el almidón, glucógeno y otros oligo y polisacáridos relacionados, entre éstas a la mayoría de las α -amilasas. Esta familia está conformada por 35 subfamilias de enzimas, de las cuales para 26 se ha documentado sólo una actividad catalítica: el rompimiento de enlaces α -1,4-glucosídicos. Este comportamiento es representativo de una de las tres subfamilias más grandes de este grupo: GH13_15 (EC 3.2.1.1). En contraste, esta familia cuenta con cinco subfamilias para las que existen reportes de más de una actividad catalítica (GH13_19, GH13_31, GH13_20, GH13_2 y GH13_4) (Stam, M.R., *et al.*, 2006).

3.2.2 Mecanismo de reacción

Las glicósido hidrolasas son enzimas que catalizan el rompimiento hidrolítico de enlaces glicosídicos. La hidrólisis de dicho enlace puede ocurrir con retención o inversión de la configuración del carbono anomérico, dependiendo de si la configuración inicial del centro anomérico se retiene o no en el producto. La catálisis de la reacción requiere de la participación de dos aminoácidos: uno actuando como donador/aceptor de protones, generalmente un ácido glutámico, y otro actuando como nucleófilo/base, casi siempre un aspartato. La ubicación espacial relativa de estos residuos determina si el producto cambiará su configuración o la retendrá. La inversión ocurre cuando el ácido glutámico, siempre localizado cerca del oxígeno formando el enlace O-glucosídico a romper, está a alrededor de 10 Å de distancia del aspartato; en tanto la retención se observa para los casos en los que ambos residuos se encuentran aproximadamente a 5.5 Å.

Para que el producto de hidrólisis retenga la configuración del sustrato, se requiere de la acción conjunta de un nucleófilo y un ácido actuando en caras opuestas del glicósido. El mecanismo de dicha reacción puede ser descrito como un doble desplazamiento, y ocurre en 2 etapas (**Figura 3**). En la primera, el oxígeno del enlace

O-glicosídico del sustrato es protonado por un residuo de ácido glutámico. Después un residuo aspartato lo sustituye a través de un ataque nucleofílica (**Figura 3a**), formándose un enlace covalente entre el sustrato y la enzima (**Figura 3b**). En la segunda etapa el grupo aceptor entrante es desprotonado por el residuo de glutamato que participó en la primera etapa, activándolo como nucleófilo para atacar al carbono anomérico unido al aspartato de la enzima (**Figura 3c, 3d, 3e**). Las glicosidasas emplean una molécula de agua como nucleófilo en la segunda etapa (**Figura 3d**), mientras las glicosil transferasas usan otro azúcar (van der Marel, M.J.E.C., *et al.*, 2002).

3.2.3 Elementos estructurales

Las α -amilasas (α -1,4-D-glucano hidrolasas) son endoglicosidasas presentes en arqueas, bacteria y eucariotas.

La primera enzima cuya estructura se determinó fue la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, conocida como Taka-amilasa A (Maatsura, Y., *et al.*, 1984). Su cristalización con acarbosa mostró la importancia de dos residuos de aspartato y uno de glutamato para la actividad catalítica (Glu230, Asp206, Asp297) (Brzozowski, A.M., *et al.*, 1997).

Estos y otros estudios revelaron que las α -amilasas están conformadas por tres dominios (Janecek, S., 1997). El primer dominio, denominado A, está constituido por un barril TIM o $(\alpha/\beta)_8$, en el que ocho láminas β paralelas están rodeadas por ocho α -hélices con conexiones β - α y α - β (**Figura 4**, rojo). Este dominio contiene a los tres residuos catalíticos.

El segundo dominio, B (**Figura 4**, morado), interrumpe al dominio A entre su tercera lámina β y tercera α -hélice. Este dominio tiene estructura variable y es característico de cada enzima. La similitud de este dominio entre distintas enzimas con actividades similares, hacen que se le responsabilice de las diferencia en el patrón de productos obtenidos por cada enzima (Janecek, S., *et al.*, 1997). En el extremo C-terminal de la enzima se encuentra el dominio C (**Figura 4**, turquesa), cuya configuración es de una llave griega formada por láminas β antiparalelas conectadas de tal manera que forman una greca, y se piensa que participa en la unión del sustrato (Robert, X., *et al.*, 2003).

Figura 3. Mecanismo de reacción de las α -amilasas, donde se muestran las reacciones catalizadas naturalmente por estas enzimas (hidrólisis (c) y transglucosilación (d)) y la reacción tema de esta tesis (alcoholólisis (e)).

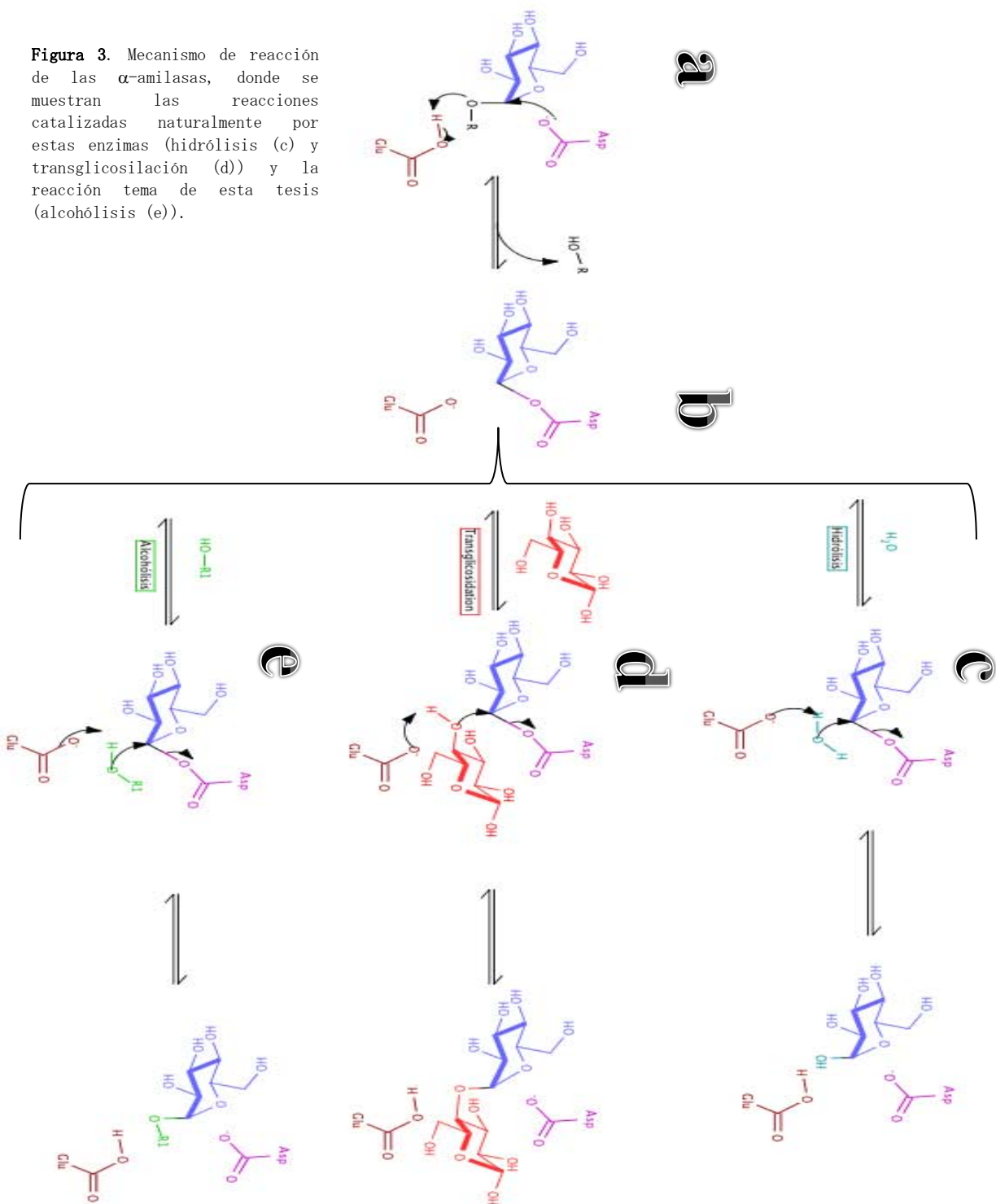
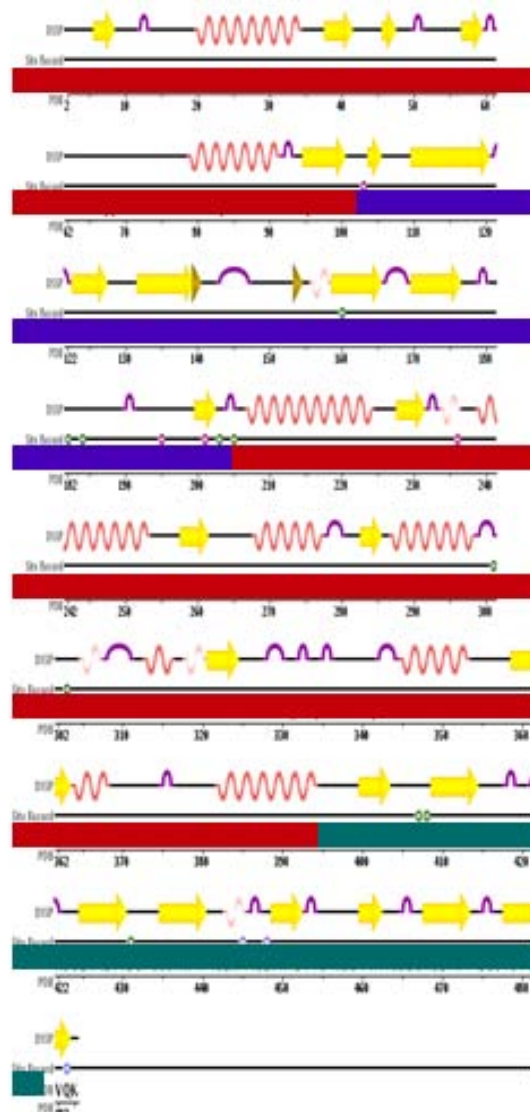
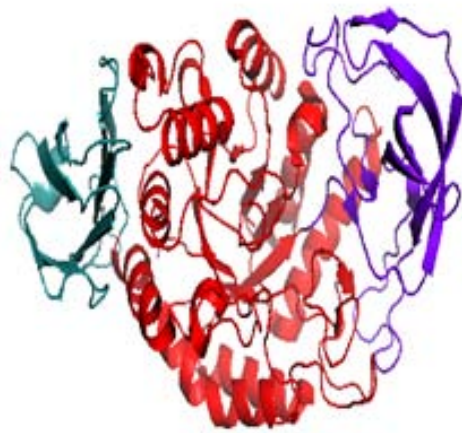
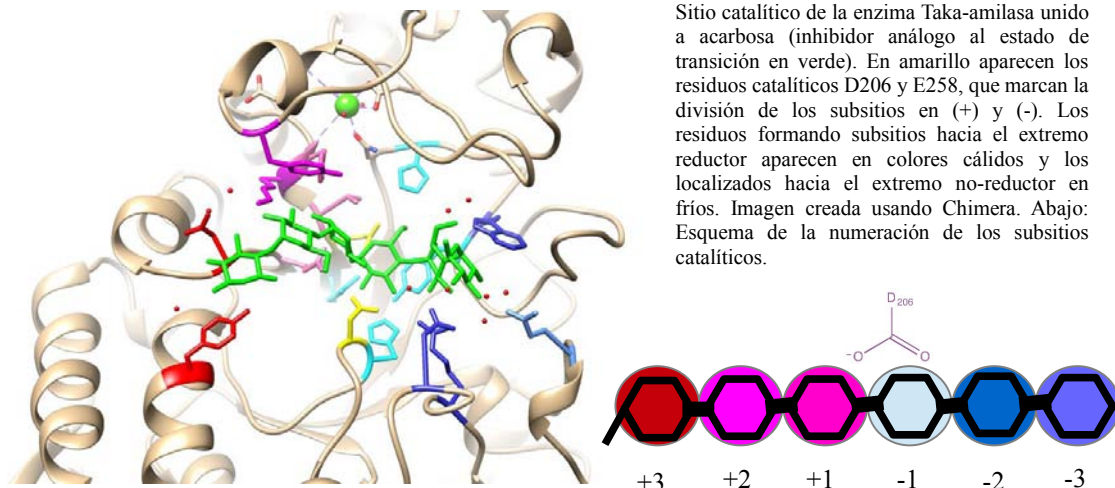


Figura 4. Representación esquemática de los dominios que componen a las α -amilasas. En rojo el dominio A, conformado por un barril TIM; en morado el dominio B; y en turquesa el dominio C, conformado por una llave griega. Imagen creada con información disponible para la estructura 3BH4 del Protein Data Bank.



Los dominios A y B están generalmente unidos por un ión Ca^{2+} , y en la hendidura formada por ambos se encuentra el sitio activo de la enzima, en el que se acomodan de 4 a 10 unidades de glucosa (**Figura 5**). Los sitios de unión al sustrato son nombrados con números usando como referencia el sitio de corte: los tres sitios encontrados hacia el extremo reductor se designan +1, +2, +3, en tanto que los localizados hacia el extremo no reductor, que varían entre dos y siete, se denominan -1, -2, -3, etc. (Davies, G.J., et al., 1997).



En las α -amilasas existen cuatro secuencias de aminoácidos altamente conservadas (conocidas como firmas moleculares) (MacGregor, E.A., *et al.*, 2001) (**Figura 6**), las cuales se resumen en la **Tabla 2**.

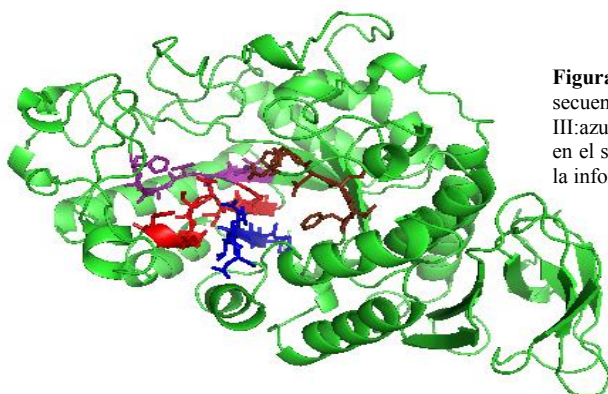


Figura 6. Estructura de la α -amilasa de *A. oryzae* con las secuencias conservadas marcadas en color (I: morado, II: rojo, III: azul, IV: café). Como se aprecia en la figura todas se encuentran en el sitio catalítico. Imagen creada empleando MacPymol usando la información de MacGregor, E.A., *et al.*, 2001.

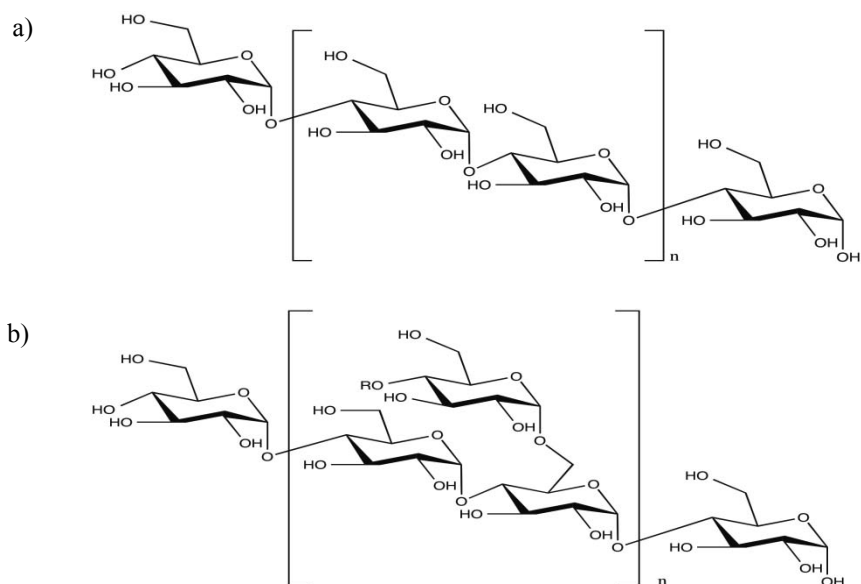
Tabla 2 Secuencias conservadas en las α -amilasas. X es un residuo hidrofóbico; B, hidrofílico; y Z, uno importante para la especificidad, por ejemplo los residuos Z de la firma II son generalmente KH en las α -amilasas y están ausentes en enzimas que rompen enlaces diferentes al α -1,4 (MacGregor, *et al.*, 2001)

| | I | II | III | IV |
|---------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Taka-amilasa | 116 VDVVANH 122 | 202 GLRIDTVKH 210 | 226 YCIGEVLD 233 | 292 FVENHD 297 |
| Consenso | XDXXXNH | GXRDXZZ | XXX(G/A)EZZZ | XXBBHD |
| Localización | Extremo C-terminal de la tercera lámina β | Cuarta lámina β | Extremo C-terminal de la quinta lámina β | Asa que conectan la séptima lámina β y séptima α hélice. |

3.2.4 Sustrato

Como ya se mencionó, el almidón es un sustrato muy atractivo para la reacción de alcoholisis, ya que, es el polisacárido de reserva más abundante en plantas. Está

constituido por una mezcla de 2 polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. Ambos son cadenas de glucosas unidas a través de enlaces α -1,4-glucosídicos. El primero es prácticamente lineal, en tanto que el segundo, presenta ramificaciones enlazadas a la cadena principal por uniones α -1,6-glucosídicas cada 24 a 30 unidades de glucosa (Zeeman, S.C., *et al.*, 2010). (**Figura 7**).



El almidón es procesado industrialmente para generar productos de mayor valor como: dextrinas, glucosa, fructosa, trehalosa, alquil glucósidos, y en la industria textil. Todos los procesos de transformación del almidón requieren de altas temperaturas para la etapa de licuefacción, en la que se rompe el almidón en oligosacáridos que, en una segunda etapa (denominada sacarificación), continúan su hidrólisis para producir glucosa y oligosacáridos de menor tamaño (Egorova, K., Antranikian, G., 2005).

3.2.5 Actividad alcoholítica de α -amilasas

Las enzimas α -amilasas han sido clasificadas por su capacidad de hidrólisis del almidón en: sacarificantes y licuefactantes. Las primeras se caracterizan por hidrolizar este polisacárido en un 50- 60%, en tanto que las segundas lo hidrolizan en un 30-40%. Las bacterias producen enzimas de ambos tipos, mientras los hongos producen principalmente enzimas sacarificantes (Vihinen, M., *et al.*, 1990).

Las enzimas sacarificantes tienen mejor desempeño en la hidrólisis del almidón que las enzimas licuefactantes gracias a que son más transglucosídicas. Esto queda

demostrado en experimentos con mezclas de α -amilasas con actividad hidrolítica como dominante y ciclodextrano glucotransferasas con una actividad mayormente transglicosídica. En los primeros de ellos, las mezclas de ciclodextrano glucotransferasa y α -amilasa en diferentes composiciones fueron más eficientes en la degradación del almidón que las dos enzimas por separado, produciendo además una mayor cantidad de glucosa después de 5 horas de reacción (del-Río, G., *et al.*, 1997). Moreno y sus colaboradores analizaron la degradación de almidón, comparando el perfil de productos formados para una α -amilasa sola o en combinación con una ciclodextrano glucotransferasa. En dicho experimento (Moreno, A., *et al.*, 2006), la acción conjunta de hidrólisis y transglicosilación es más eficiente para degradar el almidón que cualquiera de las 2 actividades por separado, como fue observado por del Río y colaboradores.

La actividad transglicosídica es de gran importancia para la reacción de alcoholólisis como lo demuestran los experimentos realizados con las α -amilasas licuefactantes de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis*, que revelan que no poseen actividad alcoholítica en presencia de almidón y alcoholes de bajo peso molecular (Santamaria, R.I., *et al.*, 1999a). En contraste, estos estudios mostraron que las enzimas sacarificantes de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* son capaces de realizar la reacción de alcoholólisis empleando almidón o sus derivados. La enzima de *A. oryzae* también ha sido empleada para llevar a cabo reacciones de transferencia y alcoholólisis usando fenil y p-nitrofenil- α -maltósidos como sustrato (Matsubara, S., 1961). La α -amilasa de *A. oryzae* también ha sido caracterizada empleando alcoholes de distintos pesos moleculares (Larsson, J., *et al.*, 2005), sin embargo, esta enzima tiene una menor actividad alcoholítica con metanol que su homóloga de *Aspergillus niger* (Santamaría, *et al.*, 1999a), con una producción de metil glicósidos, medidos como metil glucósidos producidos después de su digestión con glucoamilasa, de 0.76 mg/mL y 2.32 mg/mL, respectivamente.

Los resultados anteriores sugieren que la actividad transglicosídica es necesaria en una α -amilasa para que sea capaz de realizar la reacción de alcoholólisis. Esta conclusión es reforzada por estudios de mutagénesis en que la enzima mutante A289Y de *Bacillus stearothermophilus*, muestra actividad transglicosídica, no presente en la enzima silvestre, y se demuestra que a diferencia de la enzima silvestre, puede realizar la reacción de alcoholólisis (Saab-Rincón, G., *et al.*, 1999).

Aunque las enzimas fúngicas arriba mencionadas son sacarificantes, no son

termoestables, lo que las hace incompatibles con el proceso de disolución de almidón. Por esta razón en el grupo del Dr. Agustín López Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM se inició el estudio de la α -amilasa del organismo hipertermófilo *Thermotoga maritima*, cuya temperatura óptima es 85 °C (Liebl, W., *et al.*, 1997).

3.2.6 α -amilasas en *Thermotoga maritima* MSB8

La bacteria gram negativa *T. mar.tima* es la eubacteria hipertermófila más estudiada hasta ahora (Nelson, K.E., *et al.*, 1999). Esta bacteria; encontrada en los sedimentos de Vulcano, Italia; es uno de los organismos de vida libre con uno de los genomas más pequeños que se conoce. Es un organismo de evolución lenta con un cromosoma circular que contiene 1,877 regiones codificantes, en el que se han identificado genes adquiridos por transferencia horizontal (Nelson, K.E., *et al.*, 1999); y se ha reconstruido su red metabólica central (Zhang, Y., *et al.*, 2009), que refleja su capacidad para aprovechar una gran variedad de polisacáridos y otros azúcares.

En este organismo se han identificado tres enzimas con actividad de α -amilasa: AmyB que es una enzima intracelular con actividad óptima a 70 °C, cuyo peso molecular se estima en 50 KDa. No obstante su secuencia de 422 aminoácidos, ésta comparte solamente un 12% de identidad con otras amilasas, los aminoácidos conservados se localizan en las cuatro regiones consenso características de las α -amilasas (Lim, W.J., *et al.*, 2003). La segunda α -amilasa de este organismo, AmyC, es una enzima intracelular cuya actividad hidrolítica es máxima a 90 °C (Ballschmitter, M., *et al.*, 2006). Ésta es la única α -amilasa con una estructura cristalina resuelta para *Thermotoga maritima* cepa MSB8 (Dickmanns, A., *et al.*, 2006); sin embargo, su patrón de hidrólisis del almidón, así como su patrón de productos, estructura y secuencia difieren con respecto a otras α -amilasas.

La tercera enzima, AmyA, es una de las pocas enzimas extracelulares encontradas hasta ahora (Schumann, J.K., *et al.*, 1991), siendo la única de las tres que ha sido caracterizada con múltiples sustratos (Liebl, W., *et al.*, 1997; Moreno, *et al.*, 2010), cuyos perfiles de productos han permitido clasificarla como una enzima sacarificante (Moreno, *et al.*, 2010). Esta enzima de 62.6 KDa presenta un 30% de similitud de secuencia con otras α -amilasas e igualmente requiere Ca^{2+} para mantener su estructura terciaria y su actividad; aunque un exceso de este ión tiene un efecto

inhibitorio, que también ha sido reportado en las α -amilasas de *A. oryzae* y *A. niger* (Liebl, W., *et al.*, 1997). De los sustratos analizados con AmyA, entre los polímeros con enlaces α -1,4-glucosídicos, AmyA presentó una gran preferencia por amilosa, presentando una actividad relativa con respecto a este sustrato de 46% para la amilopectina, 29% para el glicógeno, y 2% para el pululano; degradando casi completamente la amilosa a glucosa, maltosa y maltotriosa después de 16 horas (Liebl, W., *et al.*, 1997), lo que es un indicio de un carácter sacarificante. Moreno y colaboradores (2010) estudiaron la acción de AmyA en la maltosa y maltooligosacáridos. Este estudio confirmó la naturaleza sacarificante de la enzima pues después de 48 horas de reacción, todos los sustratos probados fueron transformados a glucosa y maltosa por AmyA. Además, puso de manifiesto el carácter transglicosídico de esta enzima porque cuando se usó maltosa como sustrato, después de 24 horas la maltotriosa era el producto principal la reacción, formándose además maltooligosacáridos con 4, 5 y 6 unidades de glucosa, observándose también productos con 7 y 8 unidades para tiempos menores de reacción. La actividad transglicosídica también fue observada con sustratos conformados por 3 a 7 unidades de glucosa después de 10 minutos de reacción, siendo más evidente con los sustratos mayores a maltotriosa (Moreno, *et al.*, 2010).

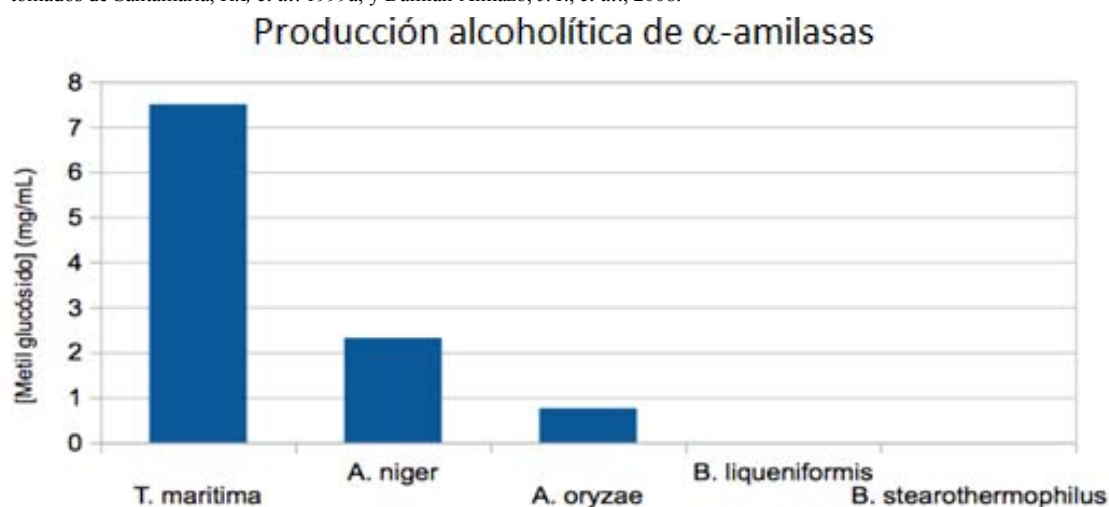
4. Antecedentes

4.1 ACTIVIDAD ALCOHOLÍCA DE AmyA DE *Thermotoga maritima*

4.1.1 Incremento de la actividad alcoholítica de AmyA de *Thermotoga maritima*

La actividad alcoholítica de la enzima silvestre AmyA de *Thermotoga maritima* es la más alta reportada hasta la fecha (Moreno, A., et al, 2010). Como se observa en la **Figura 8**, supera más de 3 veces las actividades obtenidas con enzimas fúngicas.

Figura 8. Productos de alcoholísis con metanol para distintas α -amilasas. Los productos medidos son la concentración de metil glucósidos cuantificados después de digerir con glucoamilasa a los alquil glucósidos totales producidos por las enzimas. Datos tomados de Santamaría, R.I, *et al.* 1999a; y Damián-Almazo, J.Y., *et al.*, 2008.



Esta actividad fue incrementada por ingeniería genética con la mutación H222X (X = Q, E, D) (Damián-Almazo, J.Y., *et al.*, 2008). La elección de este residuo como blanco de mutagénesis se basó en su equivalencia al residuo H238 de la α -amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*. Este aminoácido fue identificado por un alineamiento de secuencias que mostró que el patrón de conservación de este residuo entre las α -amilasas era histidina, mientras entre las neopolulanasas y ciclodextrinasas era un glutamato (Kim, T.J., *et al.*, 2000). Su sustitución en la secuencia de la enzima del bacilo mencionado incrementó la capacidad sacarificante de la enzima (Vihinen, M.,

et al., 1999) (Figura 9).

Patrón de productos con la α -amilasa de *B. stearothermophilus*

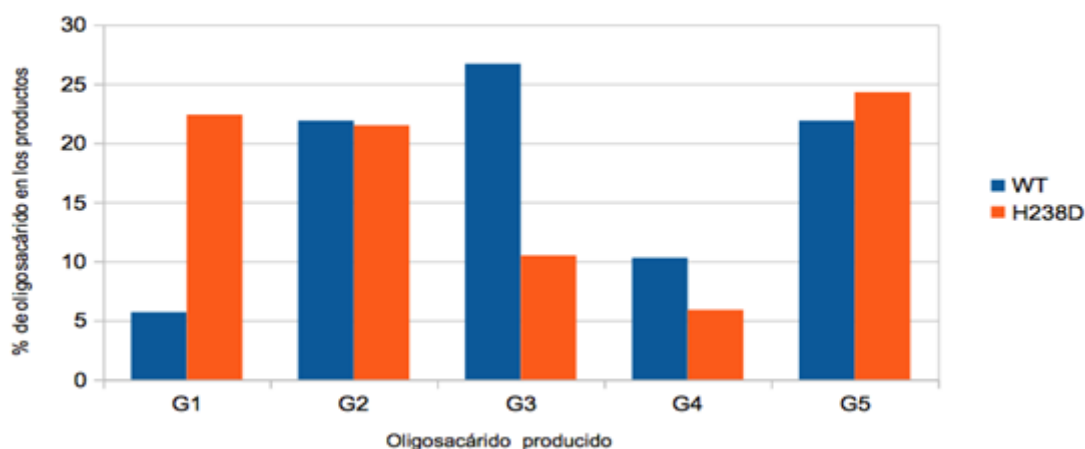


Figura 9. Incremento de la capacidad sacarificante de la α -amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus*. Productos de degradación de almidón después de una noche a 50 °C. Datos tomados de Vihinen, M., et al., 1999.

En el caso de *T. maritima* se observó que la sustitución His222Gln, incrementó la producción de alquil glucósido de la enzima, así como la relación de alcoholisis/hidrólisis de la misma (Damián-Almazo, J.Y., et al., 2008) tanto en metanol como en butanol (Figura 10).

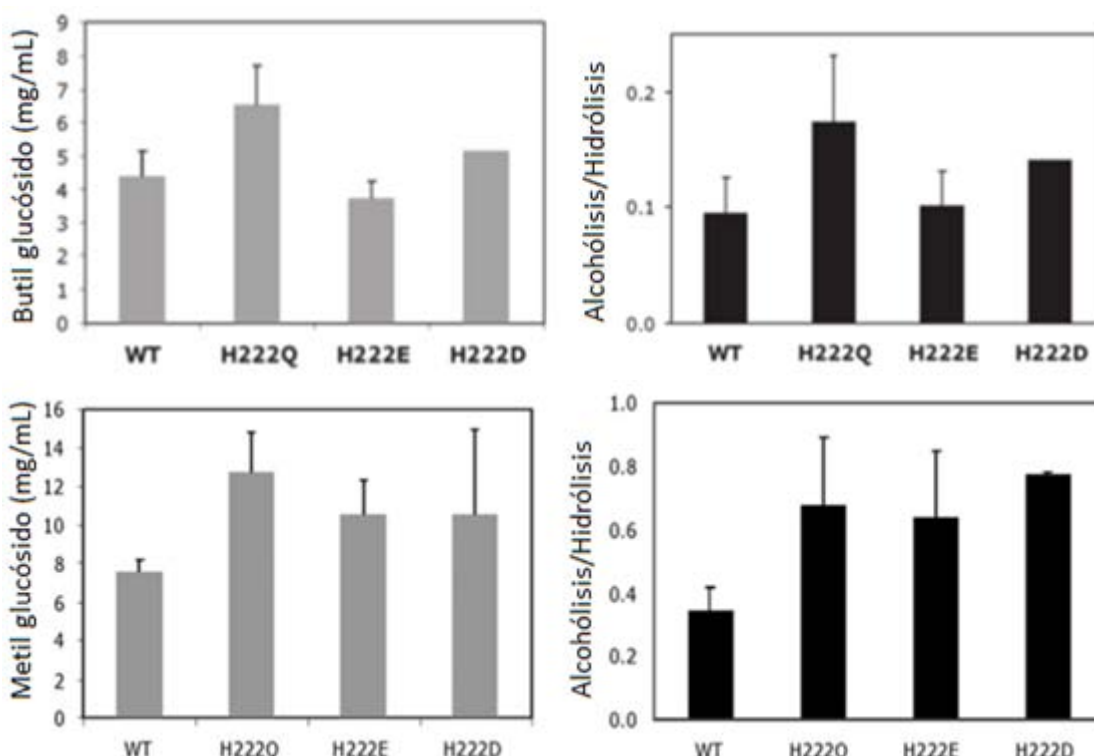


Figura 10. Producción y selectividad de la enzima silvestre AmyA y sus mutantes con butanol (arriba) y metanol (abajo). Los productos de alcoholisis fueron medidos como alquil (metil o butil) glucósidos producidos después de la digestión con glucoamilasa de los alquil glucósidos totales producidos. Imagen modificada de Damián-Almazo, J.Y., et al., 2008

4.1.2 Efecto de la composición del disolvente en la actividad alcoholítica de α -amilasas

Para la α -amilasa de *A. niger* (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a), un aumento de la concentración de metanol tenía un efecto negativo en las velocidades iniciales de la reacción de hidrólisis que se reflejaba en un menor rendimiento de la reacción (**Figura 11a**). Además, mediante cromatografía de capa fina se determinó, cualitativamente, que el aumento en la concentración de metanol produce inicialmente un incremento en la producción de metil glicósidos, para después perder actividad (**Figura 11b**) (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a).

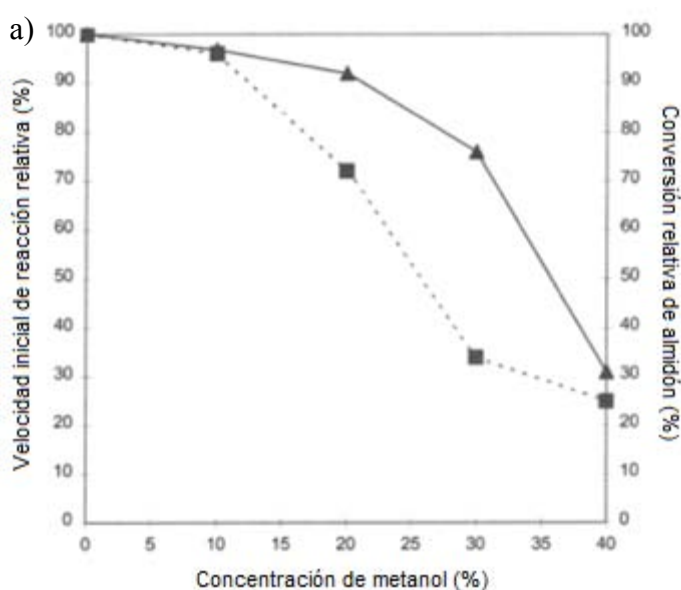
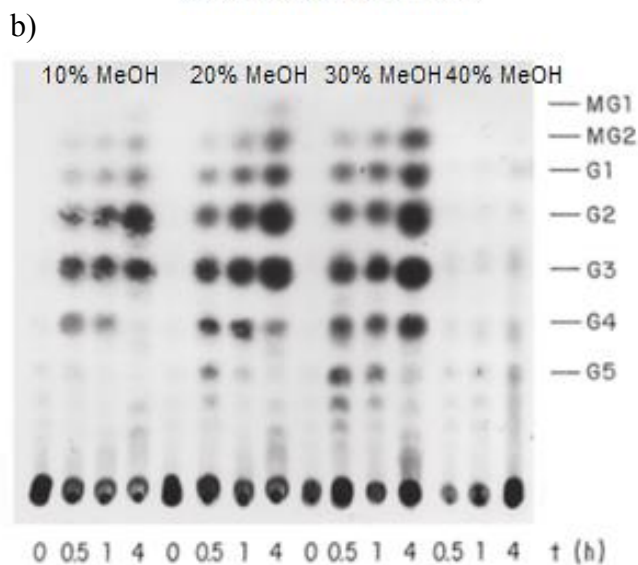


Figura 11. (a) Efecto de la concentración de metanol en la velocidad inicial (cuadrados) y la conversión relativa de almidón (triángulos) con la α -amilasa de *A. niger*: (b) Efecto del incremento en la concentración de metanol (de izquierda a derecha) para en la producción de metil glicósidos (MG1 y MG2) para la misma enzima.



Para la α -amilasa de *A. oryzae* en metanol (Larsson, J., *et al.*, 2005) encontraron un comportamiento análogo al descrito para la de *A. niger* (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a), después de cuantificar los azúcares reductores y los metil glicósidos totales. Para esta enzima, encontraron que la producción de metil glicósidos alcanzaba un máximo de producción cuando se usaba 30% de metanol, mientras la actividad hidrolítica comenzaba a caer con 20%.

En el caso de AmyA de *Thermotoga maritima* (Moreno, *et al.*, 2010) también se observó que en presencia de metanol había un máximo en la producción de metil glicósidos tanto con almidón como con maltodextrinas (**Figura 12**).

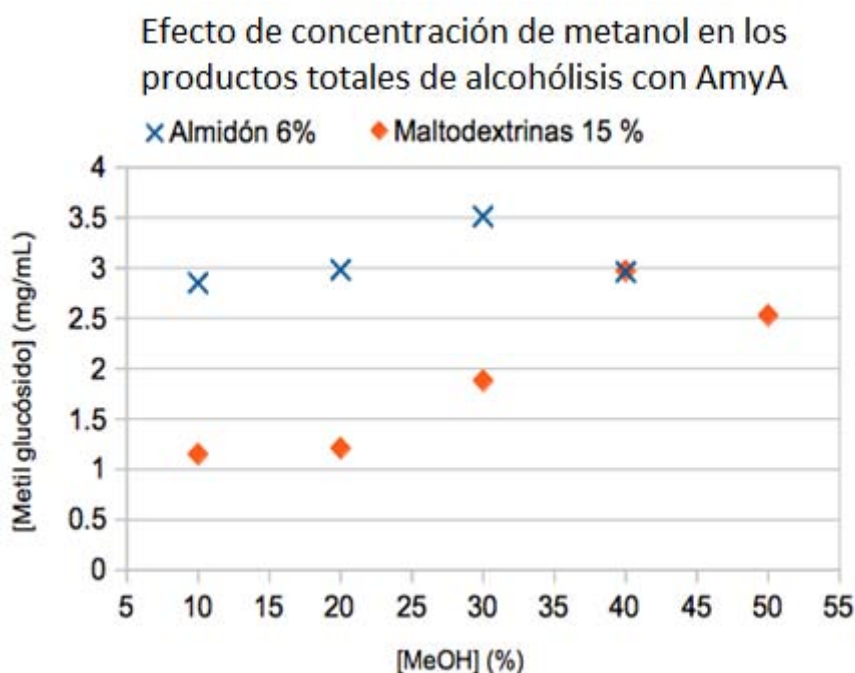


Figura 12. Efecto de la concentración de metanol en la producción de metil glicósidos de AmyA de *Thermotoga maritima* usando como sustratos almidón y maltodextrinas. Imagen creada con datos de Moreno, *et al.*, 2010

4.2 EFECTO DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN OTRAS ENZIMAS

Aunque el sistema más estudiado es la reacción de esterificación usando lipasas, también se han estudiado otras enzimas. A continuación se describen algunos ejemplos.

4.2.1 Efecto en la estabilidad de las enzimas

En un estudio con la lacasa de *Polyporus versicolor* y la quimiotripsina pancreática bovina, se evaluó el efecto de mezclas acuosas de disolventes orgánicos en la velocidad máxima de las enzimas y en la estructura terciaria de la quimiotripsina (Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989). Para analizar el efecto de los disolventes en la velocidad

máxima se comparó: el valor obtenido para cada composición (V) con la velocidad medida en una solución amortiguadora acuosa (V_0) mediante un cociente (V/V_0). Para ambas enzimas, en todos los disolventes analizados, la actividad enzimática se mantenía constante hasta alcanzar un umbral de concentración tras el cual la actividad enzimática caía rápidamente (**Figura 13(a)** y **13(b)**). Como parámetro de la estabilidad se usó la concentración de disolvente en la que la velocidad máxima de la enzima fuese la mitad de la medida en una solución amortiguadora acuosa. Esta concentración se definió como la eficacia del disolvente para desnaturalizar a la proteína (C_{50}).

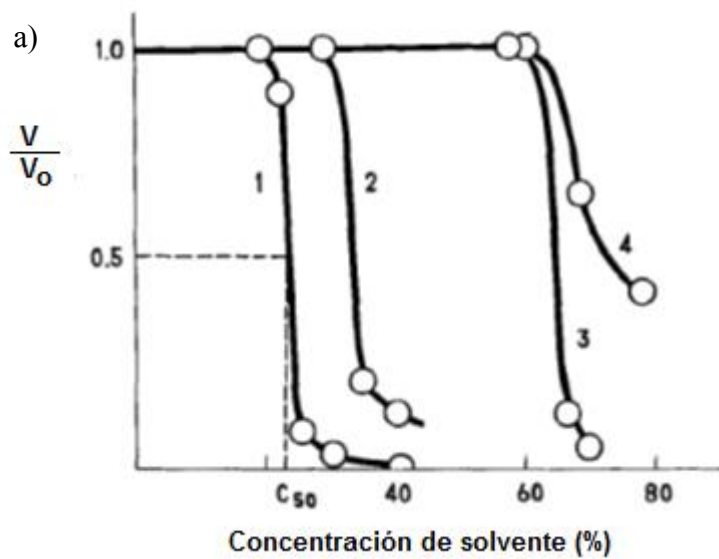
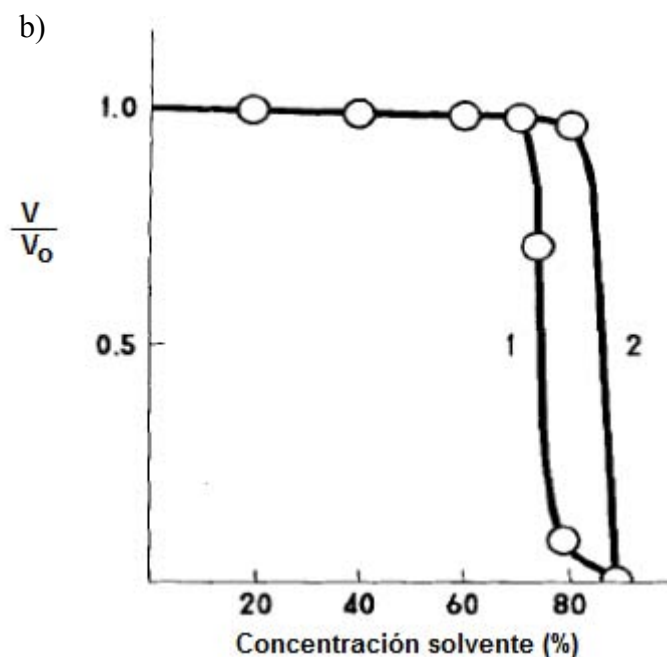


Figura 13. Efecto de la concentración de disolventes orgánicos en la velocidad máxima de la enzima. Para el estudio se usaron cocientes de velocidades máximas: la medida en una mezcla agua-disolventes orgánicos entre la medida en una solución amortiguadora acuosa. (a) quimi tripsina en (1)formamida, (2)isopropanol, (3)1,4-butandiol, (4)glicerol. (b) lacasa en (1)1,4-butandiol, (2)1,2-propandiol. Imagen modificada de Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989



La quimiotripsina también se estudió mediante fluorescencia de emisión para varias concentraciones de 2,3-butandiol, usando una longitud de excitación de 290 nm. En dicho experimento la intensidad de fluorescencia y longitud de onda de máxima emisión aumentan cuando se incrementa la exposición al disolvente de los residuos aromáticos debido a una pérdida de la estructura terciaria; lo cual se observa para concentraciones del solvente orgánico mayores a 30%. Al contrastar estos resultados con la curva de velocidad máxima relativa (V/V_0), se determinó que la concentración a la que perdía actividad la quimiotripsina coincide con la pérdida de estructura terciaria de la misma (**Figura 14**).

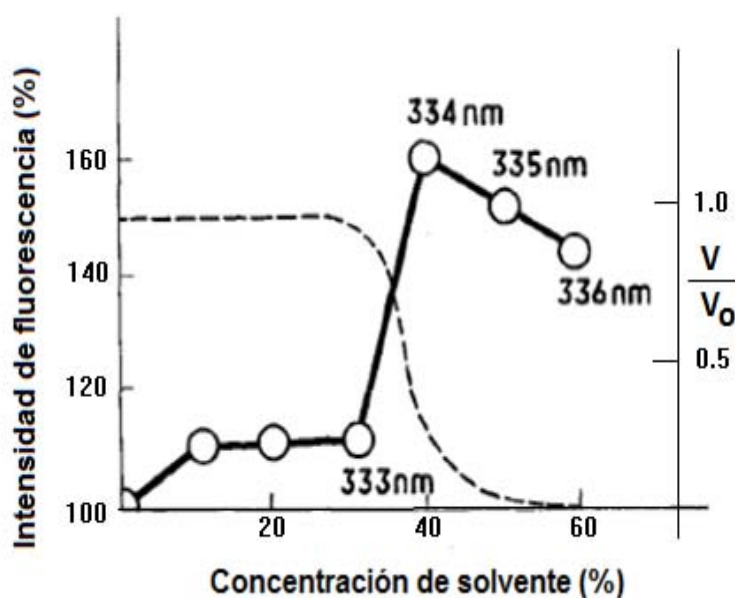


Figura 14. La caída en la actividad de la quimiotripsina coincide con la pérdida de su estructura. La línea sólida describe la dependencia de la intensidad de fluorescencia a la longitud de emisión máxima de la quimiotripsina con la concentración de 2,3-butandiol, medidas después de excitar a 290 nm. Al compararla con la línea punteada que indica la velocidad máxima relativa, vemos que la caída en la actividad de la enzima coincide con una pérdida de la estructura terciaria de la misma. Imagen modificada de Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989.

En este mismo estudio se encontró una correlación entre el logaritmo de la eficacia para desnaturalizar la enzima del disolvente referido a la concentración molar del agua, $\log C_{50}$ con el parámetro $\log P$ (**Figura 15**) encontrado en la literatura (Mozhaev, V.V., *et al.* 1998). Dicha correlación sugiere que la eficacia de un disolvente para desnaturalizar la quimiotripsina aumenta al aumentar su hidrofobicidad, ya que, $\log P$ se define como el logaritmo del coeficiente de reparto de los disolventes en la mezcla bifásica octanol/agua.

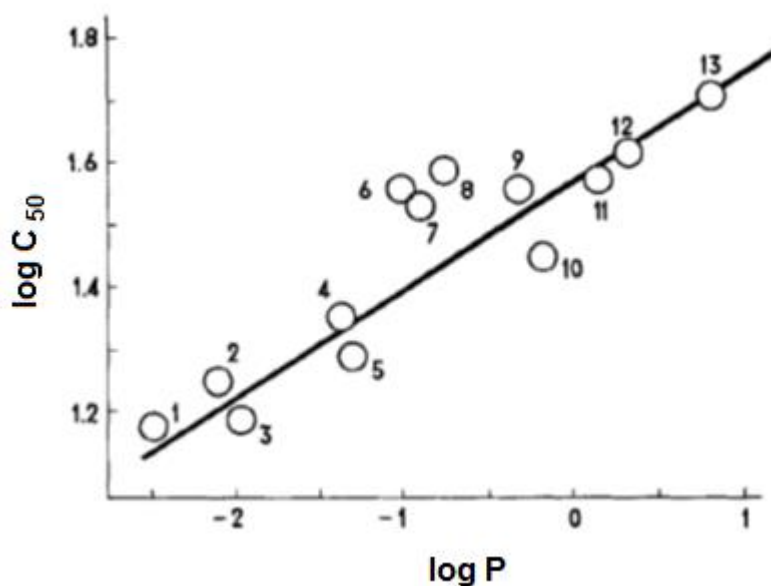


Figura 15. Eficacia del cosolvente para desnaturalizar referida a la concentración molar de agua, $\log C_{50}$, con respecto a la hidrofobicidad del disolvente, $\log P$, que corresponde al logaritmo de la constante de reparto entre octanol y agua. Se requiere una mayor concentración molar de agua para conservar la estructura de la quimiotripsina conforme aumenta la hidrofobicidad del disolvente. Imagen modificada de Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989.

Recientemente, buscando solubilizar sustratos enzimáticos insolubles en agua, como los alcanos halogenados, sustrato de las haloalcano-deshalogenasas, se analizó el efecto del disolvente orgánico en la estabilidad de la enzima. Con este fin, en un estudio con 3 haloalcano-deshalogenasas, se midió su actividad relativa en mezclas binarias agua-disolvente orgánico variando la concentración de 14 disolventes orgánicos, la mayoría alcoholes (Stepankova, V., *et al.*, 2013). Los mejores disolventes para conservar la actividad de estas enzimas resultaron ser los alcoholes; entre los que sobresalen el etilenglicol, el glicerol y el polietilenglicol PEG1000, pues para éstos las actividades enzimáticas sobrepasan las obtenidas en solución acuosa en un amplio rango de composiciones. En este mismo trabajo, fuera del grupo de los alcoholes se obtuvieron buenas actividades con el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF) (**Figura 16**).

La comparación de los espectros de dicroísmo circular en agua y en una mezcla agua-disolvente orgánico reveló que para las haloalcano-deshalogenasas en este estudio, al igual que para la quimiotripsina (Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989), la merma de actividad catalítica está asociada a una pérdida de estructura.

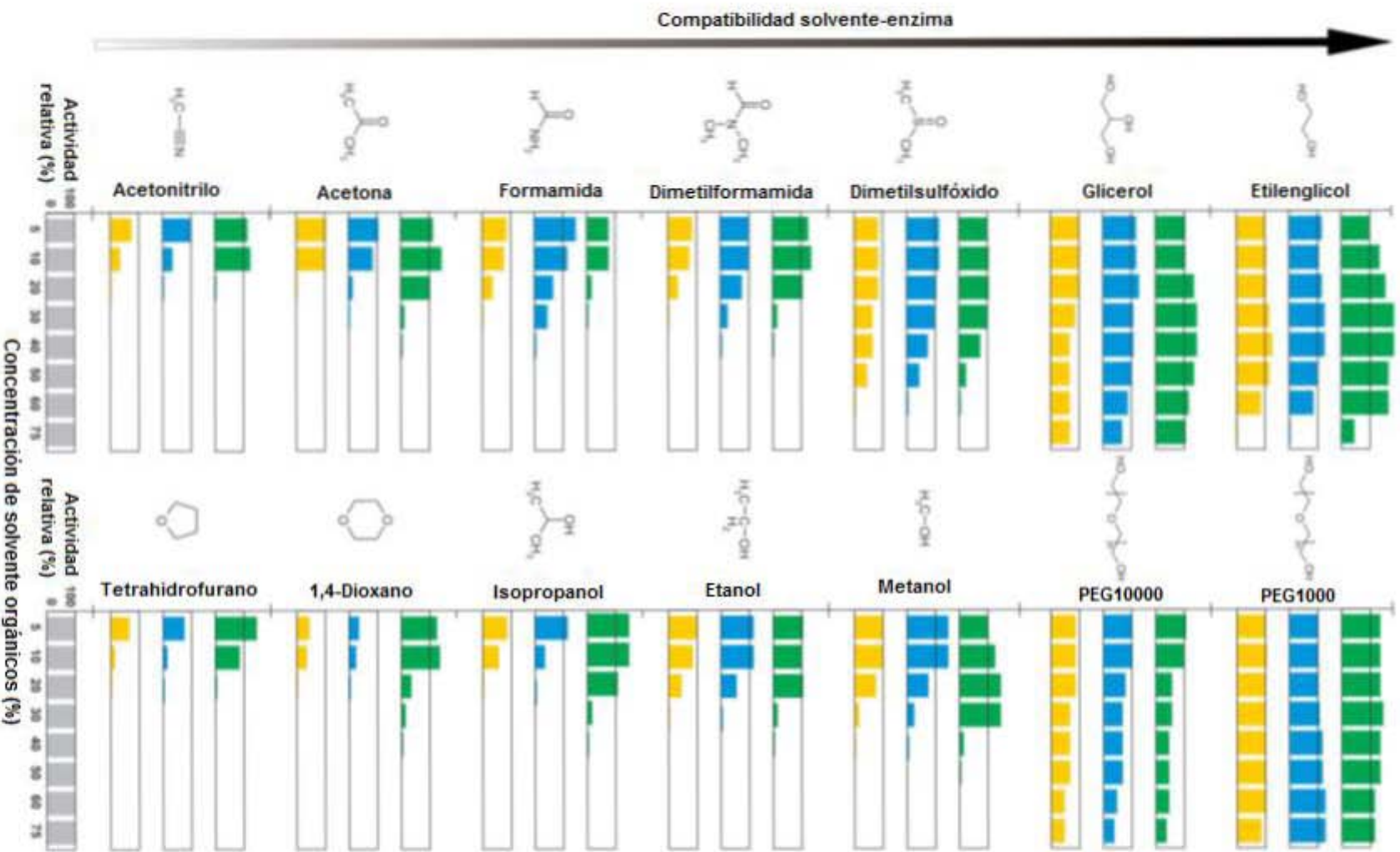


Figura 16. Actividades relativas de tres haloalcano-deshalogenasas (en verde, azul y amarillo) en mezclas binarias agua-disolvente usando varias concentraciones de disolvente orgánico. El estado de referencia es una solución amortiguadora acuosa. Los mejores cosolventes en este estudio fueron el etilenglicol, PEG1000 y glicerol para los que la actividad es mayor a la medida en la solución amortiguadora. Aunque los alcoholes resultan los mejores cosolventes, también se obtienen resultados aceptables con el DMSO y el DMF. Imagen modificada de Stepankova, V., *et al.*, 2013

4.2.2 Efecto en la especificidad enzimática

Cuando las lipasas (Svensson, E., *et al.*, 1994) y peptidasas (Bordusa, F., 2002) actúan en presencia de un alcohol catalizan la reacción de esterificación adicionalmente a la de hidrólisis. En estos casos, la composición del medio determina que reacción se lleva a cabo preferentemente, favoreciéndose la reacción de síntesis sobre la de hidrólisis cuando existe una baja actividad de agua en el medio. Bajo estas condiciones se observa que existe un contenido óptimo de agua para el funcionamiento de la enzima que cuando se expresa como actividad química de agua y no como concentración es independiente del disolvente que se use (Valivety, R.H., *et al.*, 1994).

Adicionalmente al control que ejerce la composición del medio en la posición del equilibrio químico de la reacción de hidrólisis de los ésteres y amidas con lipasas y peptidasas, controlando la relación final de concentraciones de productos y reactivos, también controla la selectividad de la reacción cuando hay más de un producto posible.

En este sentido, Bellot y colaboradores (2001) estudiaron la reacción de esterificación del glicerol con ácido oleico en hexano con la lipasa de *Rhizomucor miehei*. Para esta reacción, lograron incrementar la selectividad hacia la producción del monoglicérido (**Figura 17**) mediante la adición de 2-metil-2-butanol (2M2B). Este fenómeno es explicado por el cambio en la actividad de los productos y los reactivos con la adición del 2M2B.

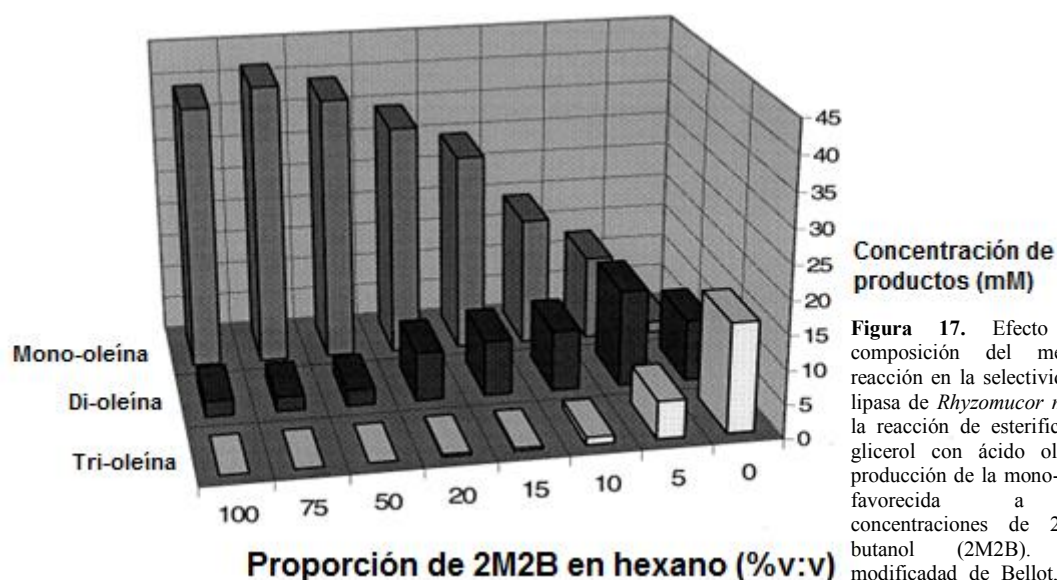


Figura 17. Efecto de la composición del medio de reacción en la selectividad de la lipasa de *Rhizomucor miehei* en la reacción de esterificación de glicerol con ácido oleico. La producción de la mono-oleína es favorecida a altas concentraciones de 2-metil-2-butanol (2M2B). Imagen modificada de Bellot, J.C., *et al.*, 2001.

4.3 ESTABILIDAD DE LAS α -AMILASAS EN UNA MEZCLA ALCOHOL-AGUA

Los trabajos con las α -amilasas de *A. niger* (Santamaría R.I., *et al.*, 1999a); de *A. oryzae* (Larsson, J., *et al.*, 2005); y de *T. maritima* (Moreno, A., *et al.*, 2010) mencionados en el capítulo anterior, mostraron que la actividad alcohólica en metanol aumenta al incrementar la concentración de alcohol. Sin embargo, este aumento no continúa indefinidamente: Santamaría y sus colaboradores (1999a) reportaron una caída brusca en la actividad de la α -amilasa de *A. niger* al pasar de una concentración de metanol de 30 a 40%, observada en cromatografía de placa fina; lo cual también fue observado por Larsson y sus colaboradores (2005) con la enzima de *A. oryzae*. El trabajo de Santamaría además sugiere que esta caída se debe a la inactivación de la enzima por desnaturalización, ya que, después de medir la actividad residual de la enzima de *A. niger* a 60 °C con diferentes concentraciones de metanol, su tiempo de vida media, calculado a partir de las curvas de decaimiento, disminuye con el incremento en la concentración de metanol (**Figura 18**).

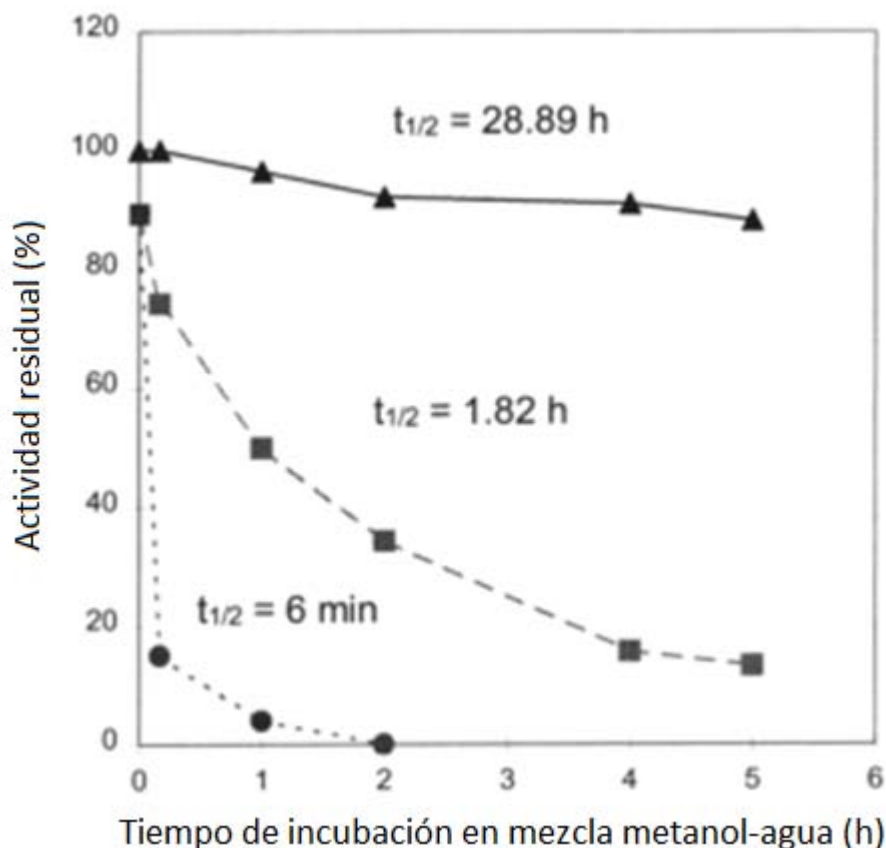


Figura 18. Curvas de decaimiento de la α -amilasa de *A. niger* en metanol. Actividad residual como función del tiempo de almacenado a 60 °C de la α -amilasa de *A. niger* en una mezcla con metanol al 0% (triángulos), 20% (cuadrados), 40% (círculos). Se observa que con el aumento en la concentración de metanol, el tiempo de vida media de la enzima disminuye. Imagen modificada de Santamaría, R.I., *et al.*, 1999a

Los resultados encontrados con AmyA de *T. maritima* (Moreno, A., et al., 2010) colocan a AmyA por arriba de las enzimas fúngicas pues produce metil glicósidos aún a 40% metanol. Lo anterior coincide con la mayor termoestabilidad de AmyA comparada con la enzima de *A. niger*. A pesar de ello, es deseable hacer a AmyA más estable en mezclas alcohol-agua, ya que como se ha observado (Santamaría, R.I., et al., 1999a; Larsson, J., et al., 2005), la producción de alquil glicósidos aumenta con la concentración de alcohol en el medio.

Una estrategia para incrementar la estabilidad de AmyA en soluciones acuosas de alcoholes es la sustitución de aminoácidos en su secuencia. Un obstáculo para elegir aminoácidos a sustituir es que no existe una estructura de difracción de rayos X disponible para AmyA. Además, no hay antecedentes de otras enzimas hipertermófilas cuya estabilidad en disolventes orgánicos se haya aumentado, manteniendo además su actividad. Por ello es necesario considerar a la evolución dirigida como una opción para mejorar la estabilidad de esta enzima en una mezcla agua alcohol.

4.4 EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Al exponer a las enzimas a ambientes que no se presentan en la naturaleza, éstas pueden presentar problemas de especificidad, actividad o estabilidad. Para producir enzimas funcionales en estas nuevas condiciones, en la actualidad, se cuenta con varias herramientas como: modificación química (Díaz-Rodríguez, A., Davis, B.G., 2011), diseño racional (Lehmann, M., Wyss, M., 2001) y evolución dirigida (Kuchner, O., Arnold, F.H., 1997); siendo las últimas dos las más usadas.

Se han realizado estudios experimentales (Wong, C.H., et al., 1990; Chen, K., Arnold, F.H., 1993; Lehmann, C., et al., 2014) y computacionales (Bae, E., et al., 2008) para incrementar la estabilidad de diversas enzimas, sin embargo, todas las publicaciones encontradas en la literatura han sido realizadas con enzimas de organismos mesófilos y por tanto, no es claro como extender sus conclusiones a una enzima hipertermófila. Además, para incrementar las posibilidades de éxito cuando se usa el diseño racional es necesario contar con una estructura de difracción de rayos X o modelamiento molecular. Esto permite relacionar la secuencia primaria de una proteína con la estructura, la función y el mecanismo de reacción de la enzima para poder producir enzimas con mejores características.

Por ello, dado que la estabilidad de la enzima hipertermófila en una mezcla de agua con un disolvente orgánico, constituye una situación no presente en la naturaleza para la que no existen antecedentes, y que no se cuenta con una estructura de difracción de rayos X, la evolución dirigida es la opción más viable.

Esta metodología se lleva a cabo a través de varias rondas de mutagénesis, evaluación de la actividad y selección de las variantes mejoradas. A diferencia de los procesos evolutivos naturales, en los que hay múltiples y variables presiones evolutivas, en la evolución dirigida se realiza bajo una presión selectiva única y controlada, que mejora una característica particular. El éxito de esta técnica depende de la correcta construcción de una librería de mutantes creada al azar y del uso de un método de evaluación de la actividad catalítica que permita discriminar de una gran cantidad de mutantes aquellas variantes que han mejorado con respecto a la proteína original bajo una presión de selección impuesta (Kumar, A., Singh, S. 2012).

En el caso de la librería de mutantes de AmyA de *Thermotoga maritima*, sería deseable encontrar un método capaz de distinguir las enzimas mutantes funcionales, y así disminuir el tiempo requerido para explorar la biblioteca.

La concentración de alcohol en el medio de reacción permitirá incrementar los rendimientos de la reacción de alcoholólisis. Sin embargo, en el caso del butanol y otros alcoholes de cadena larga, este aumento está limitado por su solubilidad. Por otro lado, el aumento en la concentración de alcohol y otros disolventes orgánicos está también restringido por su efecto detrimental en la estabilidad de la enzima.

En el presente trabajo se exploran diferentes estrategias dirigidas a lograr un aumento en la concentración de alcohol en el medio de reacción, por un lado, trabajando sobre la barrera física que impone la solubilidad de los alcoholes en medios acuosos y, por otro, sobre la estabilidad de la proteína en un medio con alto contenido de alcohol.

5. Hipótesis

La producción de alquil glucósidos usando AmyA de *Thermotoga maritima* aumentará si se incrementa la concentración del alcohol en la mezcla de reacción.

6. Objetivo General

Mejorar la producción de alquil glucósidos de la enzima AmyA de *Thermotoga maritima*.

7. Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de cosolventes sobre la actividad de AmyA de *Thermotoga maritima*.
- Identificar la composición óptima de cosolvente-alcohol en la mezcla de reacción para maximizar los productos de alcoholólisis de la enzima AmyA
- Crear una banco de mutantes al azar de la α -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima*. Diseñar un método de selección que permita identificar a las enzimas activas bajo las condiciones de estudio.
- Identificar mutantes de AmyA de *Thermotoga maritima* con una estabilidad incrementada en la mezcla alcohol- agua.

En el siguiente capítulo se aborda lo referente a los dos primeros objetivos y en el capítulo 9 se presentan los esfuerzos realizados para cubrir los 3 últimos objetivos. Puesto que se trata de estrategias diferentes se presentan como dos capítulos aparte que tuvieron diferente grado de avance, pero que formaron parte de este trabajo.

8. Estrategia para incrementar el contenido de alcohol en el medio de reacción manteniendo a AmyA activa

8.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y disolventes empleados en esta y otras secciones fueron Aldrich, a menos que se indique lo contrario. En el caso de los disolventes, estos tuvieron una pureza de reactivo químico o superior, siendo el acetonitrilo de grado cromatográfico.

8.1.1 Producción y purificación de la enzima silvestre AmyA de *Thermotoga marítima*

Se transformaron células electrocompetentes *E. coli* ER con la construcción pET22a/AmyA sin péptido señal con una etiqueta 6xHistidina (Damian, J.Y., 2006; Anexo I). Las colonias resultantes de esta transformación se usaron para inocular 200 mL de medio LB con ampicilina 200 µg/mL, el cual se mantuvo en agitación a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4 a 600 nm, se indujo la expresión de AmyA usando IPTG 1 mM, y se continuó la incubación a 20 °C toda la noche. El cultivo se centrifugó a 63 000 g por 15 minutos a 4 °C. El botón de células resultante se resuspendió en 10 mL de amortiguador NaCl 300 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7.7. La suspensión se sonicó a 4 °C en intervalos de 30 segundos usando el sonicador Branson Sonifier 450. El extracto se clarificó centrifugándolo a 84 000 g, y se filtró a través de una membrana con poros de diámetro 0.22 µm. La disolución resultante se purificó por cromatografía de afinidad. Para ello se usó una columna de NTA-Ni y un equipo de FPLC .K TA marca Amersham usando como eluyente una disolución de NaCl 300 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7.7 a un flujo de 5 mL/min, a una presión máxima de 0.3 MPa, lavando con imidazol 120 mL por 5 minutos, eluyendo la proteína con un gradiente de 120 a 300 mM de imidazol en 2 minutos. Las fracciones purificadas de AmyA se reunieron y se calentaron a 72 °C por 20 minutos, clarificando después en una centrífuga a 84 000 g. La disolución se dializó 2 veces a 4 °C por 12 h usando una membrana de 10 KDa; primero con 500 mL de una disolución Tris 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7 a la que se le agregaron 100 µL de DTT 0.5 mM y 400 µL de EDTA 500

mM. Después, con 1 L de una disolución de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM a pH 7.

8.1.2 Medición de la actividad de AmyA en mezclas de disolventes

8.1.2.1 Preparación de las muestras

Cada punto experimental correspondió al menos a una muestra preparada independientemente por duplicado. Todas las mezclas de reacción fueron preparadas con 50 mg de almidón disueltos en aproximadamente 500 μ L de la mezcla de disolvente correspondiente, compuestos por los disolventes orgánicos respectivos más una solución amortiguadora acuosa de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM a pH 7. La medición del volumen de todos los disolventes se realizó con jeringas Hamilton, adicionándose por separado a la mezcla de reacción.

Se emplearon muestras con cosolvente y sin cosolvente. El orden de adición de los disolventes fue: cosolvente, butanol, solución amortiguadora. Para las mezclas de reacción conteniendo únicamente butanol, éste estaba en concentraciones de 2, 6 y 10% v/v. En los experimentos con cosolvente se usó butanol a una concentración aproximada de 10% (0.03 fracción molar de moléculas de disolvente; siendo la fracción molar el cociente de moles de la sustancia de interés entre los moles de todas las sustancias) y un cosolvente a la concentración correspondiente. Los 5 diferentes cosolventes explorados fueron: acetonitrilo (MeCN); dimetilsulfóxido (DMSO); dimetilformamida (DMF); 2-metil-2-propanol (2M2P); 2-metil-2-butanol (2M2B). Para MeCN se evaluaron fracciones molares de cosolvente de 0.026 y 0.052. Para, 2M2P, 2M2B se usó una fracción molar de 0.026 con respecto al número total de moléculas de disolvente. Para el DMSO y DMF se evaluó una fracción molar de cosolvente de 0.052. Además, para el MeCN y DMSO se hizo un estudio sistemático concentraciones variables de butanol (fracción molar 0.03-0.055), manteniendo constante el cosolvente a una fracción de 0.052, en el que se disminuyó la temperatura de las muestras a 50 °C antes de la adición de la enzima.

8.1.2.2 Reacción enzimática

Todas las mediciones de volumen fueron realizadas con micropipetas. Las

mezclas de reacción descritas en la sección anterior, se precalentaron durante 5 minutos a 85 °C en un agitador de temperatura controlada Eppendorf con agitación constante. Además se agitaron con un vórtex antes de adicionar 2U de enzima (actividad específica con almidón: 2 mM de azúcares reductores producidos/min/ μ L de solución enzimática) y se mantuvieron a esa temperatura a menos que se indique lo contrario. Todas las muestras se agitaron con vórtex después de la adición de la enzima y antes del muestreo, pero permanecieron sin agitación durante la reacción. Se tomaron volúmenes de muestra de 40 μ L, y la reacción se detuvo utilizando 40 μ L de HCl 0.12 M. La muestra se enfrió y después se neutralizó con 20 μ L de NaOH 0.24 M; ajustando el volumen final a 300 μ L. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 17 000 g para sedimentar partículas sólidas. A todas las muestras se les midió su contenido de azúcares reductores y butil glucósidos totales.

8.1.2.3 Medición de los productos totales de hidrólisis de almidón

Los productos totales de hidrólisis se midieron como equivalentes de azúcares reductores que reaccionan con el ácido 3,5-dinitrosalicilato (DNS) en medio básico (Summer, J.B., Howell, S.F., 1935), cuantificados con una curva de calibración de glucosa, usando una concentración de glucosa de 3-15 mg/mL. Del volumen final de la muestra de la sección anterior se tomaron 50 μ L que se mezclaron con 50 μ L de la disolución de DNS. La mezcla resultante se calentó a 85 °C por 3 minutos y después se enfrió en hielo. Su absorbancia a 540 nm se midió usando un robot Safire Tecan.

8.1.2.4 Medición de productos totales de alcoholisis

Los productos de alcoholisis fueron medidos como butil glucósidos obtenidos después de cortar los enlaces α -1,4-glucosídicos de los butil glicósidos producidos por AmyA con glucoamilasa marca EDC. Con este fin se tomaron 100 μ L del volumen final de muestra obtenido en la sección 8.1.2.2 se le adicionaron 10 μ L de una disolución de glucoamilasa al 10% y se dejó reaccionando a 50 °C por 12 h en un termociclador. Se centrifugó, se filtró y se analizó la muestra en un cromatógrafo de líquidos marca Dionex Ultimate 3000 RS con un flujo de 1 mL/min, usando una mezcla de agua en acetonitrilo al 25% como eluyente. La separación se realizó con una columna Prevail Carbohydrate ES, 5 μ m a 30 °C y la cuantificación se realizó con un detector por dispersión de luz Alltech ELSD 2000ES a 80 °C con un flujo de nitrógeno de 1.7 L/min.

8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.1 Efecto de la Concentración de Butanol sobre la reacción de butanólisis

Para determinar cómo afecta la concentración de butanol la actividad de AmyA se midieron los productos totales de la reacción de hidrólisis y los de alcoholólisis para tres mezclas de reacción con diferentes concentraciones de butanol, usando como sustrato almidón. Como se puede observar en la **Figura 19a**, después de 24 horas de reacción, la producción de butil glicósidos es proporcional a la concentración de butanol en el medio de reacción. Por otro lado, se observa una caída en los productos de hidrólisis conforme la concentración de butanol aumenta (**Figura 19b**). Ambos efectos conllevan a un aumento en la selectividad de la reacción hacia la alcoholólisis, medida como productos de alcoholólisis entre productos de hidrólisis (A/H) (**Figura 19c**). Esto concuerda con los estudios de alcoholólisis de almidón con metanol llevados a cabo con otras α -amilasas:

Tabla 3. Efecto del metanol en la actividad alcoholítica e hidrolítica de distintas α -amilasas

| α -amilasas | Actividad alcoholítica | Actividad hidrolítica | Referencia |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>A. niger</i> | Con cromatografía de capa fina (TLC), se observa que la producción alcoholítica aumenta al pasar de 10 a 30% de metanol en el medio, con una desaparición casi total al incrementarlo a 40%. | La velocidad inicial de reacción para la hidrólisis de almidón cuando se usó 40% metanol fue el 20% de la obtenida en ausencia de este disolvente. | Santamaría, R.I. et al. 1999a |
| <i>A. oryzae</i> | Al incrementar la concentración de metanol de 15 a 30%, la producción de metil glicósidos aumentó de 1.5 mM a 3.5 mM, cayendo a menos de 1.5 mM cuando se empleó 40% de metanol. | Con 20% metanol, la producción de azúcares reductores fue de 70 mM, siendo de 20 mM cuando se usó 25% metanol y menor a 10 mM cuando para 35% de metanol. | Larsson, J., et al., 2005 |
| <i>T. maritima</i> | La producción de metil glicósidos correspondiente a la concentración de 10% metanol fue de 14.7 mM. Esta producción fue máxima cuando se empleó 30% metanol correspondiendo a 18.1 mM, tras lo cual cayó a 15.3 mM cuando se incrementó la concentración de metanol a 40%. | Datos no incluidos en el estudio. | Moreno, A., et al. 2010 |

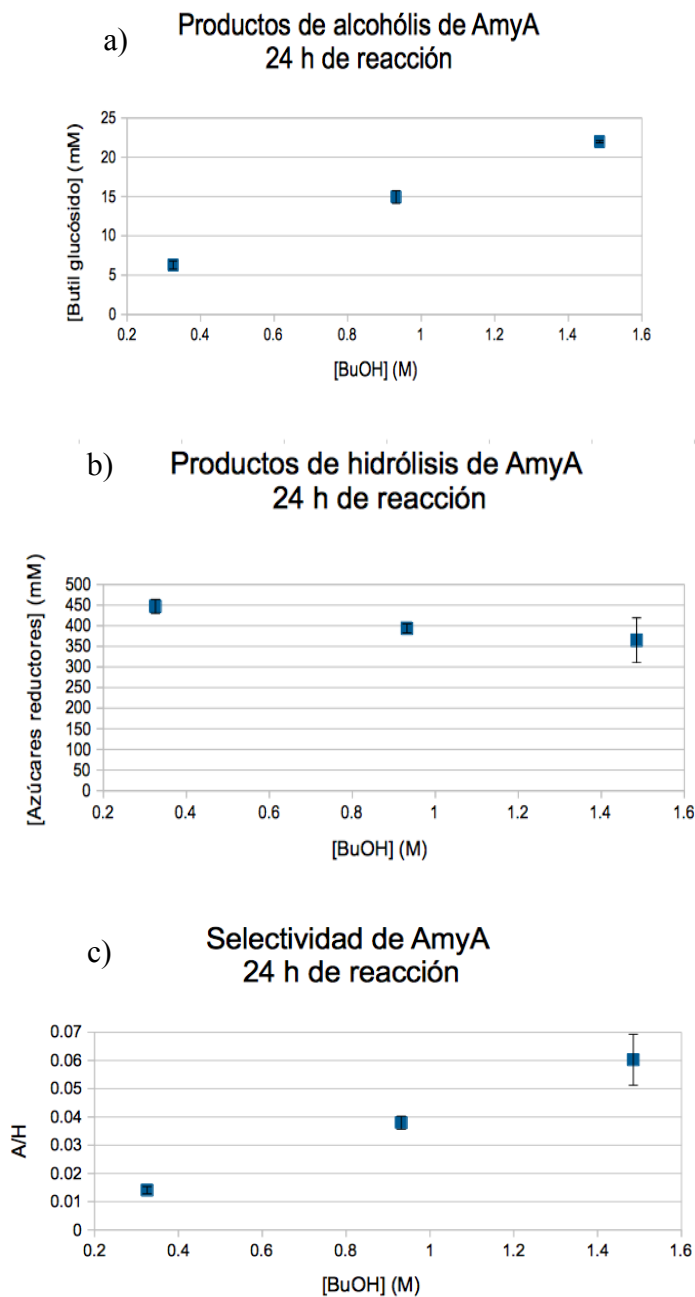


Figura. 19 Efecto de la concentración de butanol después de 24 horas de reacción en (a) productos de alcoholisis, (b) productos de hidrólisis, (c) selectividad de la reacción. Todas las propiedades medidas parecen correlacionar con la concentración de butanol en el medio de reacción.

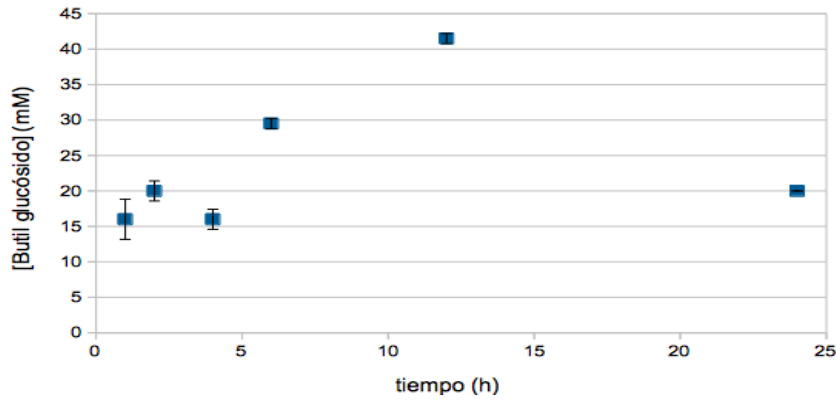
Ya que sólo el estudio de Santamaría y colaboradores (1999a) analiza la cinética de la reacción de alcoholisis para una α -amilasa, de manera cualitativa mediante TLC, es necesario evaluar la producción de butil glicósidos y azúcares reductores en el tiempo con AmyA. Además, dado que se alcanzó el límite de solubilidad del butanol en agua (1.52 M) sin observarse la disminución en la producción de butil glucósidos, es deseable incrementar la concentración de butanol en la mezcla de reacción manteniendo una sola fase mediante el uso de cosolventes. Ambos puntos son abordados en las siguientes

secciones.

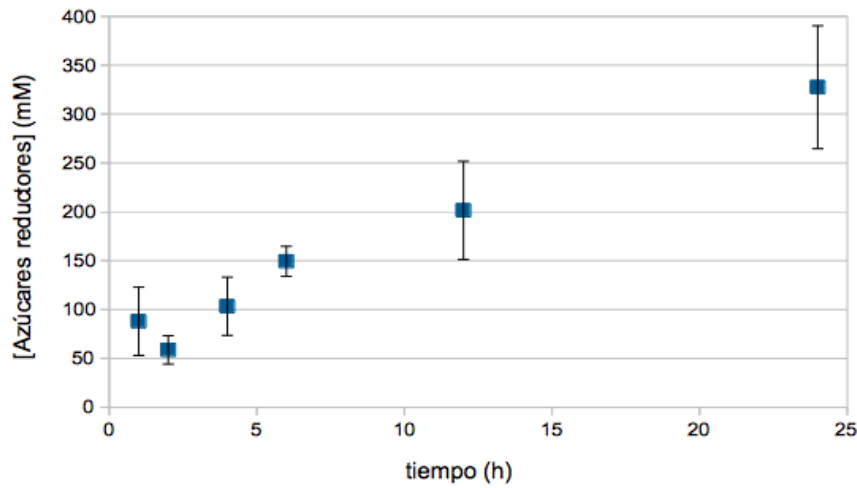
8.2.2 Determinación del tiempo óptimo de reacción para producción de butil-glucósidos.

Para asegurar que la medición se realizara en las condiciones de máxima productividad de butil glicósidos con AmyA, se midieron los productos de alcoholísis e hidrólisis a diferentes tiempos de reacción (**Figura 20**) usando la concentración más alta de butanol posible para mantener la reacción en una sola fase (1.52 M). Como se puede observar en la **Figura 20**, mientras la concentración de butil glicósidos producidos es máxima a las 12 horas de reacción, la producción de azúcares reductores continúa incrementándose después de este tiempo. El perfil de reacción observado indica que la producción de butil glicósidos está dirigida por un efecto cinético y no termodinámico; ya que, una vez alcanzando el equilibrio termodinámico entre productos y reactivos, la concentración de todas las especies en la mezcla permanece constante y, después de 24 horas existía una composición diferente a la encontrada después de 12 horas. El incremento continuo en la producción de azúcares reductores hasta las 24 horas, sugiere que la enzima continúa siendo activa hasta este tiempo. La aparente desaparición de productos de alcoholísis a las 24 horas de reacción es intrigante, pues se ha demostrado que la enzima no es capaz de hidrolizar al butil glucósido y que este compuesto es estable al incubarlo a 85 °C durante este tiempo en el medio de reacción (**Anexo II**). Así pues, el mecanismo por el cual ocurre la hidrólisis del enlace O-glucosídico con el grupo butilo permanece para ser determinado en trabajos complementarios.

a) Perfil de la reacción de alcoholisis con AmyA



b) Perfil de la reacción de hidrólisis con AmyA



c) Perfil de selectividad de AmyA

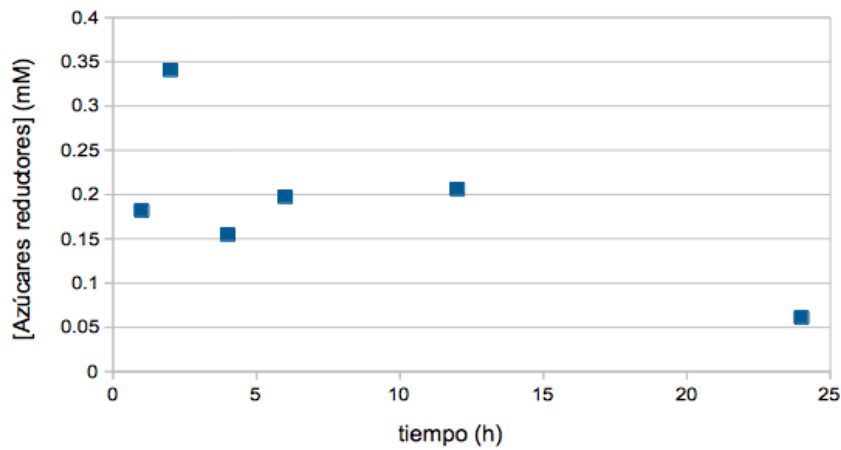


Figura 20. Cinética de AmyA de (a)alcoholisis, (b)hidrólisis, (c)selectividad de la reacción. La concentración de BuOH usada en todos los experimentos fue de 1.52 M. A las 2 horas de reacción se observa la selectividad más alta, sin embargo, es para las 12 horas de reacción que se observa un mayor producción de butil glucósidos con una selectividad comparable a la de tiempos menores de reacción para los que hay una menor producción de azúcares reductores.

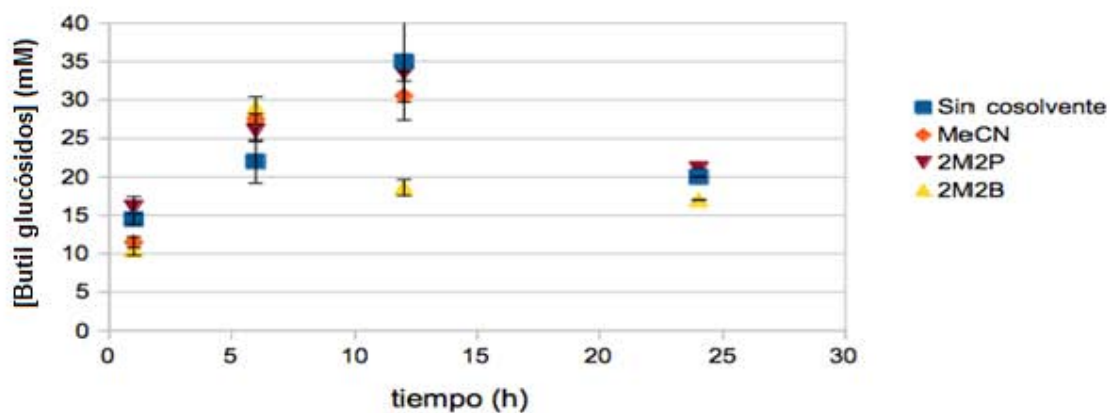
8.2.3 Uso de cosolventes en la mezcla de reacción.

La dependencia encontrada entre la producción de butil glicósidos y la concentración de butanol en el medio de reacción sugiere que un aumento en la concentración de butanol en la mezcla de reacción incrementa la cantidad de butil glicósidos. Sin embargo, la concentración de 1.52 M corresponde al límite de solubilidad de butanol en agua, por tanto, no es posible realizar la reacción en una sola fase adicionando únicamente una mayor cantidad de butanol a la mezcla de reacción.

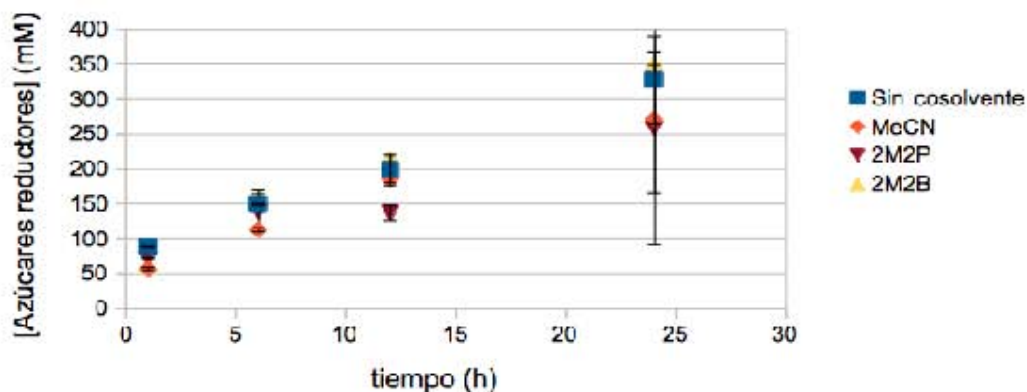
Para aumentar la cantidad de butanol en la mezcla de reacción, manteniendo una sola fase, se incorporaron cosolventes en la mezcla de reacción. Aunque para la reacción con sólo butanol los mejores resultados se obtuvieron para el tiempo de 12 horas, para los experimentos con cosolventes se evaluó la producción de butil glicósidos y azúcares reductores para 1, 6, 12 y 24 horas para asegurarnos que se tenía un comportamiento cinético similar cuando el cosolvente estaba presente.

Inicialmente se probaron acetonitrilo (MeCN), 2-metil-2-propanol (2M2P), 2-metil-2-butanol (2M2B), usando una fracción molar de moléculas de disolvente de 0.026 (**Figura 21**). Los primeros 2 se eligieron porque son completamente miscibles con BuOH y agua, mientras el 2M2B, se usó porque ha sido exitosamente probado como cosolvente modulador de la selectividad en esterificación con lipasas (Bellot, J.C., *et al.*, 2001). Como se puede observar en la **Figura 21a**, no hubo un efecto significativo en la producción de butil glucósidos por la presencia del cosolvente, salvo para el 2M2B, que después de seis horas parece disminuir la producción de butil glucósido. En cuanto a la reacción de hidrólisis, se observó una pequeña disminución en presencia de MeCN y de 2M2P. Sin embargo, ya que se había elegido la concentración máxima de 2M2B que se podía agregar manteniendo una sola fase y tanto para el 2M2P como el 2M2B no fue posible disolver mucho más butanol con esta concentración de cosolvente, se decidió no continuar el estudio con estos cosolventes, pues además de no permitir la disolución de más butanol no aumentan la actividad alcohólica ni disminuyen significativamente la hidrolítica (**Figuras 21a y 21b**).

a) **Productos de alcoholisis de AmyA en presencia de cosolventes**



b) **Productos de hidrólisis de AmyA en presencia de cosolventes**



c) **Selectividad de AmyA en presencia de cosolventes**

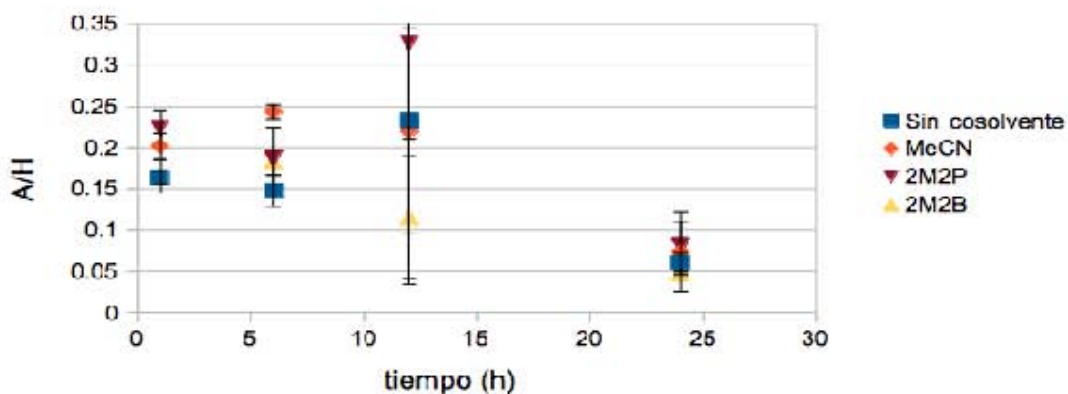


Figura 21. Cinéticas de reacción con distintos cosolventes para la reacción de (a) alcoholisis, (b) hidrólisis, (c) la selectividad de la reacción, usando AmyA. Fracción molar de cosolvente de 0.026.

Con el fin de explorar otras opciones, se probaron otros cosolventes considerando su completa miscibilidad con agua y con butanol. Los cosolventes elegidos fueron DMF y DMSO; y se repitió al MeCN para mantenerlo como control de los datos obtenidos anteriormente. Se mantuvo constante la fracción molar de moléculas de disolvente del cosolvente de 0.052 (**Figura 22**). En general, se observó una ligera disminución tanto de los productos de hidrólisis como de alcoholisis en presencia de cosolventes, siendo este efecto mucho más marcado para la DMF. Sin embargo, la posibilidad de incrementar la cantidad de butanol en la mezcla de reacción puede compensar la pérdida de actividad para la generación de butil glicósido.

Para la reacción en DMF se observó en todas las mediciones una menor cantidad de productos de alcoholisis e hidrólisis que cuando se utilizó cualquiera de los otros cosolventes. Podemos explicar esto considerando las interacciones intermoleculares entre los cosolventes y el almidón. Cuando se usó DMF, se observó que éste solubilizó el almidón; mientras que, para todos los cosolventes analizados se observó que la adición de agua y el calentamiento son necesarios para disolver el almidón. Lo anterior, se interpretó como una mayor interacción entre el almidón y el DMF, en comparación con el resto de los cosolventes. Esta fuerte interacción entre almidón y DMF podría ser la causa de la menor producción de azúcares reductores y butil glicósidos cuando este cosolvente está presente, pues la catálisis enzimática requiere la desolvatación del sustrato antes de su unión con la enzima; y la afinidad del sustrato por el sitio catalítico podría no ser suficiente para compensar la energía requerida para arrancar las moléculas de disolvente alrededor del sustrato que impiden su unión al sitio catalítico de la enzima.

Las interacciones intermoleculares podrían ser también las causantes de la menor producción de butil glucósido en las reacciones donde se usaron DMSO y MeCN como cosolventes al compararlos con el producto de la reacción donde sólo estaba presente el butanol a la misma concentración. Esto puede deberse a que las interacciones butanol-cosolvente están más favorecidas que las de butanol-agua, lo cual puede ser deducido si consideramos que el butanol y el MeCN son solubles en todas proporciones, en tanto que la solubilidad del butanol en agua está limitada. Es posible entonces que el butanol se encuentre más solvatado por los cosolventes haciéndolo menos disponible para la reacción.

a) Efecto del cosolvente en la producción alcohólica de AmyA

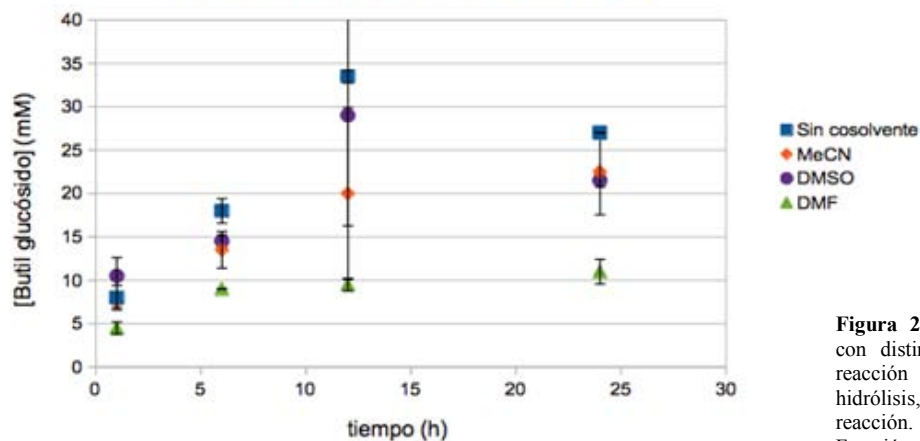
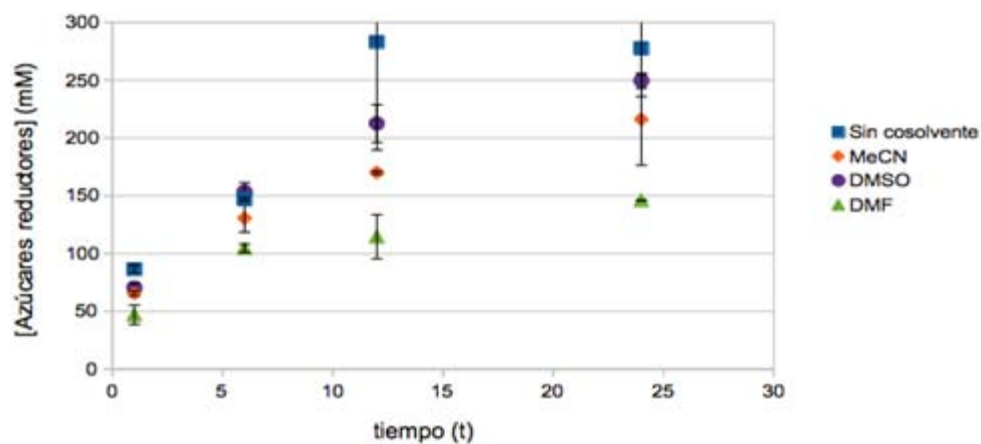


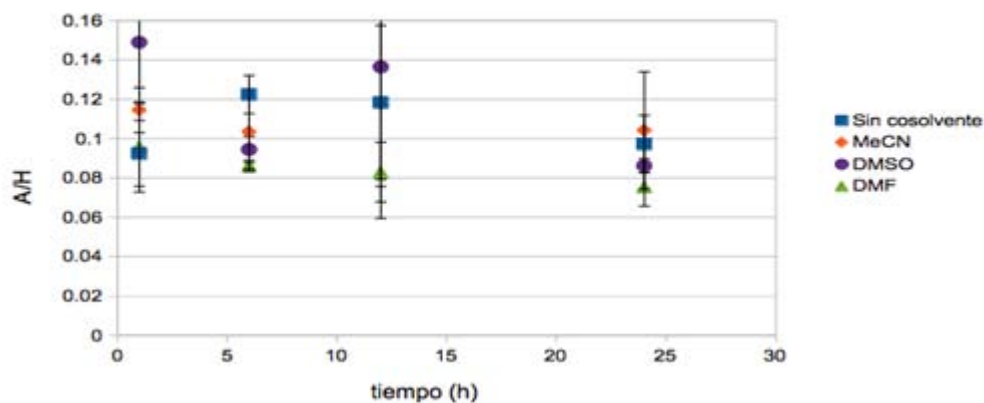
Figura 22. Cinéticas de reacción con distintos cosolventes para la reacción de (a) alcoholisis, (b) hidrólisis, (c) la selectividad de la reacción.

Fracción molar de cosolvente de 0.052 con respecto a las moléculas totales de disolvente.

b) Efecto del cosolvente en la producción hidrolítica de AmyA



c) Efecto del cosolvente en el perfil de selectividad de AmyA



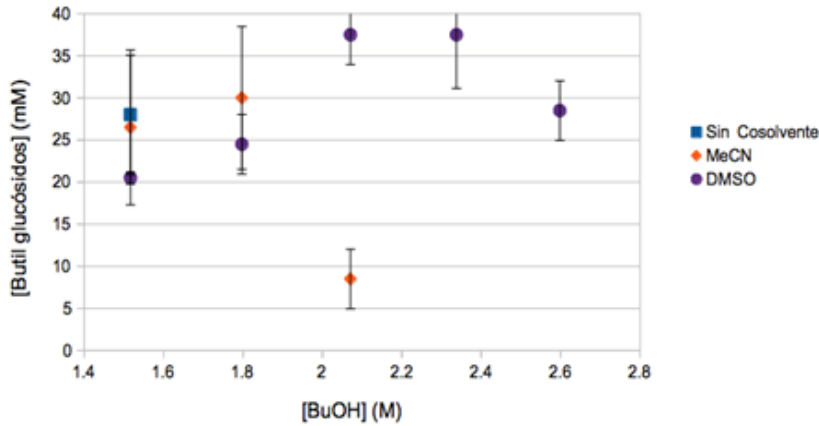
8.2.4 Efecto de concentración de butanol sobre las reacciones de alcoholólisis en presencia de cosolventes

Para saber si el decremento en la producción en la reacción de alcoholólisis en presencia de DMSO y MeCN se debe a una menor disponibilidad del butanol debido a la presencia de cosolventes se aumentó la concentración de butanol, manteniendo la concentración de cosolvente constante (**Figura 23**). Así, al incrementar la concentración de butanol, la relación entre moléculas de cosolvente por moléculas de alcohol disminuyó, y con ello la tasa de interacciones entre ambos tipos de moléculas. Una menor tasa de interacciones cosolvente-butanol conduce a una mayor disponibilidad del butanol para reaccionar. Por ello, al aumentar la cantidad de butanol, manteniendo la concentración de cosolvente constante, nuestra hipótesis fue que los productos de alcoholólisis medidos aumentarían. Esto es lo que se observó tanto para el MeCN como para el DMSO (**Figura 23a**), antes de observarse una caída en la producción de butil glicósidos a una concentración de butanol de 2.3 M en el caso DMSO y de 1.8 M en el de vs MeCN.

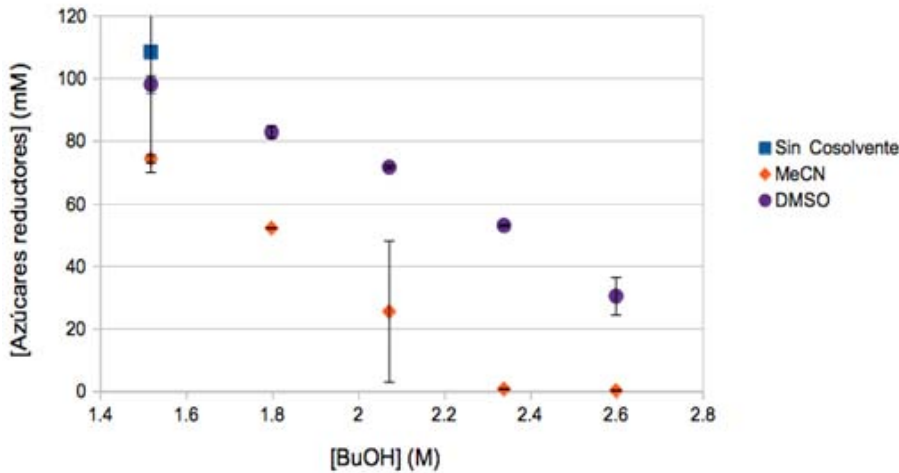
Para las α -amilasas de *A. niger* (Santamaría, R.I., et al., 1999a), *A. oryzae* (Larsson, J. et al., 2005) y *T. marítima* (Moreno, A., et al. 2010) también se observa una caída en la producción de metil glicósidos al superarse una concentración de metanol de 11.8 M, concentración a la cual se obtiene un máximo de productos de alcoholólisis, siendo ésta más pronunciada para las enzimas de *A. niger* y *A. oryzae*. Para *A. niger* es posible relacionar esta caída en la producción con una pérdida de actividad, probablemente ligada a una pérdida de estructura, ya que al aumentar la concentración de metanol en la mezcla de reacción la actividad residual de la enzima disminuye (Santamaría, R.I., et al., 1999a). Por ello, el decremento en la producción de butil glicósidos con AmyA en las mezclas de reacción debe estar también relacionada con la desnaturalización de la enzima.

Como se puede observar en la **Figura 23b**, la reacción de hidrólisis disminuye conforme la concentración de butanol aumenta, a diferencia de la de alcoholólisis que muestra primero un incremento hasta un valor máximo tras el cual decrece tanto para DMSO como MeCN (**Figura 23a**). Esto da por resultado que la relación de la reacción de alcoholólisis/hidrólisis incrementa conforme se aumente la concentración de butanol (**Figura 23c**).

a) Efecto de la concentración de butanol en la producción alcohólica de AmyA en presencia de cosolvente



b) Efecto de la concentración de butanol en la producción hidrolítica de AmyA en presencia de cosolvente



c) Efecto de la concentración de butanol en la selectividad de AmyA en presencia de cosolvente

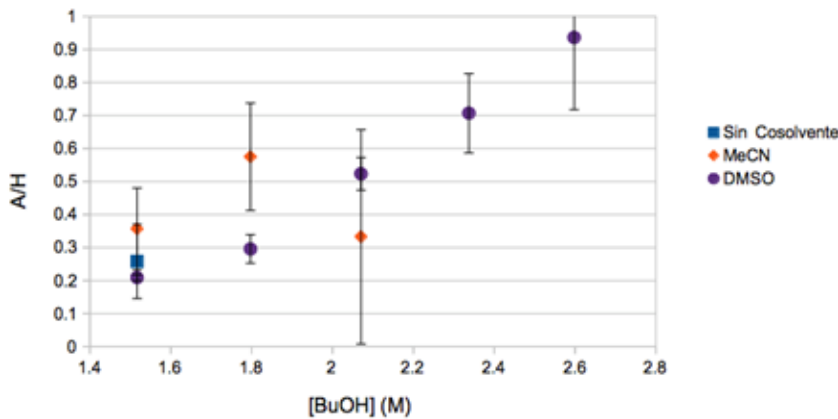


Figura 23. Efecto de la concentración de butanol cuando se mantiene la concentración de cosolvente constante (0.052 fracción molar) en (a) productos de alcóholisis, (b) productos de hidrólisis, (c) selectividad de la reacción después de 12 horas de reacción. Tanto para DMSO, como para MeCN se observa una caída en los productos de hidrólisis con el aumento de [BuOH], en tanto que los productos de alcóholisis presentan un incremento antes de empezar a caer, lo que resulta en un incremento de la selectividad. Para disminuir la variación en estos experimentos, se enfriaron las muestras hasta 50 °C antes de agregar la enzima para evitar explosiones producidas por formación de gases al abrir la tapa del recipiente de la mezcla de reacción.

En la **Figura 23**, cuando se incrementó la concentración de butanol, gracias a la presencia de los cosolventes (**Tabla 4**) hubo un aumento en la producción de butil glicósidos. Los incrementos máximos alcanzados fueron: de 7-9% con MeCN y butanol 1.79 M, y entre 24 y 34% con DMSO y butanol 2.34 M. Aunque la producción de butil glicósidos comienza a caer al aumentar más allá de la concentración de butanol señalada con ambos cosolventes, la reacción de hidrólisis disminuye monotónicamente con el incremento de butanol. Esto da por resultado un incremento muy importante en la selectividad de la reacción hacia la alcoholólisis. Usando MeCN y una concentración de butanol 1.79 M se obtuvo una selectividad que duplicó la obtenida cuando se usó sólo butanol en el límite de su solubilidad (1.52 M); en tanto que se triplicó con DMSO y butanol 2.34 M. Con una concentración de butanol de 2.60 M en presencia de DMSO la producción de butil glicósidos fue menor a la máxima concentración del producto de alcoholólisis alcanzada en presencia de este cosolvente, sin embargo, ésta fue similar a la alcanzada con sólo butanol 1.52 M, y su relación alcoholólisi/hidrólisis fue casi de 1, un valor que triplica el obtenido en ausencia de cosolventes.

Tabla 4. Producción alcoholólica y selectividad de AmyA a diferentes concentraciones de butanol usando una fracción molar de 0.052 de cosolvente después de 12 h de reacción. Datos corresponden a los reportados en **figuras 23a** y **23c**. Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar.

| [BuOH] (M) / cosolvente | 1.52/sin cosolvente | 1.79 /MeCN | 2.34/DMSO | 2.60/DMSO |
|----------------------------|------------------------|------------|-----------|-----------|
| [butil glucósido] (mM) | 28(7) | 30(8) | 37.5(6) | 28.5(4) |
| A/H | 0.26(0.1) | 0.57(0.2) | 0.73(0.1) | 0.94(0.2) |

La presencia del cosolvente DMSO hizo posible disolver butanol en una concentración más allá de su límite de solubilidad a 9.75%, manteniendo una sola fase y la actividad de la enzima. Esto hace posible pensar en el uso de alcoholes como hexanol y octanol para la reacción de alcoholólisis, para los cuales se reportó ausencia de producción de alquil glicósidos con *A. oryzae* (Larsson, J., *et al.*, 2005), atribuyendo esta falta de reactividad a su baja solubilidad que corresponde a 0.7 y 0.06%, respectivamente.

Al igual que para otras α -amilasas estudiadas, el aumento de la concentración de alcohol en el medio de reacción no aumenta indefinidamente la producción de la reacción de alcoholólisis de AmyA. Dicho incremento tiene un máximo, tras el cual decae.

Aunque se observa una gran variación entre los experimentos realizados únicamente con butanol en diferentes días, esta variación es pequeña entre estas muestras cuando corresponden al mismo día, siendo siempre la producción correspondiente a 12 horas la mayor. Así, podemos suponer que la inclusión de muestras en las que el único disolvente orgánico era butanol hizo posible compararlas con otras con cosolventes obtenidas el mismo día, sin tomar en cuenta la variación con otros días. La gran variación que se observó entre las muestras con cosolventes correspondientes a 12 horas de reacción se redujo disminuyendo la temperatura de la mezcla de reacción a 50 °C antes de agregar la enzima como se muestra en la **Figura 23**. Aunque esto incrementó la variabilidad de la muestra con sólo butanol, la muestra con DMSO sigue siendo mayor a la que únicamente tiene alcohol después de considerar el error en el experimento.

La caída de la actividad hidrolítica en presencia de DMSO con respecto a la reacción donde no está presente decremanta la conversión total de la reacción por lo que se puede recuperar materia prima para usarse en otro ciclo de la reacción o agregar enzima fresca.

9. Evolución dirigida para aumentar la estabilidad de AmyA de *Thermotoga maritima* a alcoholes

9.1 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1.1 Generación de un banco de mutantes de AmyA de *Thermotoga maritima*

Se introdujeron mutaciones al azar en el gen de AmyA de *Thermotoga maritima*, contenido en el vector pET22a (Damián Almazo, J.Y., 2006; **Anexo III**). Para generar la librería se empleó una mezcla desbalanceada de desoxiribonucleótidos (dGTP 2 mM, dATP 2 mM, dCTP 10 mM, dTTP 10 mM (Cadwell, R.C., Joyce, G.F., 1994)) preparada con dNTP Fermentas y un exceso de cloruro de magnesio (50 mM). La amplificación fue catalizada por la Taq polimerasa producida en el laboratorio en una solución amortiguadora Tris 300 mM pH 9, con sulfato de amonio 150 mM, cloruro de magnesio 70 mM. Como iniciadores se usaron los oligonucleótidos Amy2 (CGA TCC AAG CTT CAC TTT TTG AAA ATG TAC GC) y EcoRI AmyA (TCG GAT CCG AAT TCC TGC TTT CAA ACG) (Damián Almazo, J.Y., 2006). Se realizaron 30 ciclos de PCR, y cada ciclo constaba de tres etapas: 50 segundos a 90 °C, 50 segundos a 55 °C y 72 °C por 2.5 minutos minutos y se hizo un ciclo final de extensión a 72 °C por 10 minutos. El producto de PCR fue purificado mediante cromatografía en gel de agarosa al 0.8% y el kit de purificación de PCR marca Roche. Posteriormente, éste fue digerido empleando las enzimas de restricción Eco RI y Hind III Fermentas, e insertado en el vector pET22a (**Figura 24**).

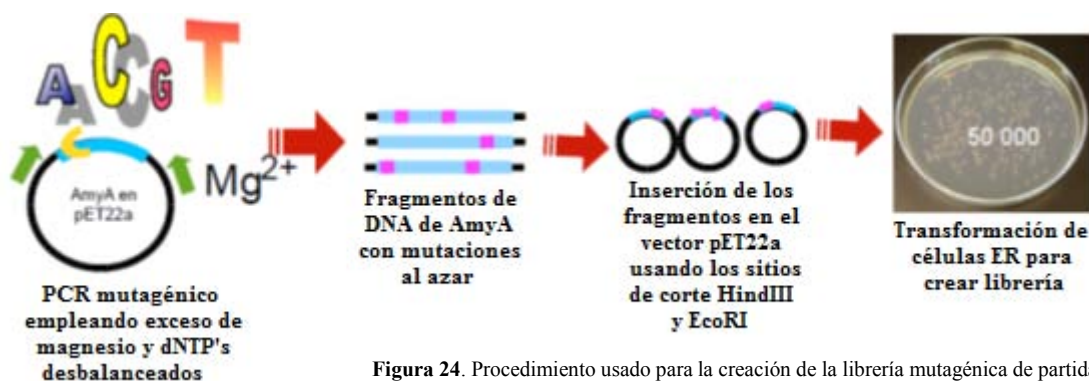


Figura 24. Procedimiento usado para la creación de la librería mutagénica de partida.

Los plásmidos con los genes mutantes se utilizaron para transformar por electroporación células MC1061 Δ trpF/F'_{Fer} de *E. coli*, altamente competentes proporcionada por el Dr. Humberto Flores Soto del IBt. Se secuenciaron 6 de las colonias obtenidas en su extremo 5', usando el oligo T7 forward, para estimar la variabilidad de la librería obtenida. El resto de las colonias se lavó con medio LB líquido; éste se centrifugó. El botón resultante se empleó para obtener plásmido utilizando el kit de purificación Roche.

9.1.2 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en mezclas acuosas de butanol-acetonitrilo en la actividad hidrolítica de AmyA

Todas las reacciones catalíticas con AmyA se llevaron a cabo a 85 °C en un termomezclador de temperatura controlada Eppendorf sin agitación. Las muestras precalentadas se mantuvieron a esta misma temperatura el tiempo que duró el precalentado. Las reacciones fueron agitadas después de adicionar la enzima y antes de la toma de muestra para su análisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

9.1.2.1 Determinación del diagrama de fases de la mezcla butanol-agua-acetonitrilo a temperatura ambiente

Se realizó la titulación volumétrica por triplicado de mezclas de MeCN-solución amortiguadora acuosa Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM a pH 7 adicionando butanol a temperatura ambiente. Se usaron volúmenes de 20 mL de mezcla MeCN-solución amortiguadora aumentando de 0 a 10 mL de MeCN. Se adicionó butanol usando una bureta con agitación constante hasta observar turbidez en la mezcla que no desaparecía con la agitación. Terminada cada titulación se registraron los volúmenes de cada componente y se obtuvo su porcentaje volumen/volumen. Estos puntos fueron localizados en un diagrama ternario.

9.1.2.2 Producción de AmyA para los ensayos catalíticos del perfil de estabilidad

Dos mililitros de medio LB suplementado con ampicilina 200 μ g/mL se

inocularon con células ER transformadas con el plásmido que contenía el gene codificante de AmyA silvestre y se incubaron a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4 a 600 nm, se adicionaron 2 µL de IPTG 1 M, tras lo cual se continuó la incubación durante 18 horas a 20 °C. Se centrifugaron las células a 17 000 g y se usó el sobrenadante para las pruebas catalíticas.

9.1.2.3 Efecto de la concentración de butanol en la estabilidad de AmyA

Se prepararon 2 tipos de mezclas: con y sin almidón al 2%. Para cada composición de disolventes se prepararon 3 mezclas de ambas clases, todas con un volumen total de 100 µL. Se empleó una solución amortiguadora Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM a pH 7 con MeCN al 18% (fracción molar: 0.11 a 0.13) y concentraciones variables de butanol (0, 5, 10, 15, 20 o 25% que corresponden a las concentraciones molares 0, 0.83, 1.67, 2.50, 3.34 o 4.17 M).

Las mezclas sin almidón se calentaron por 10 minutos a 85 °C, tras los cuales se adicionó un volumen de 20 µL del sobrenadante obtenido en la sección 9.1.2.2 a cada una, continuando el calentamiento. Transcurridos 5 minutos, a cada mezcla se le adicionó una mezcla con almidón y la misma composición de disolventes, previamente precalentada 10 minutos a 85 °C. La mezcla resultante se agitó. Pasado un tiempo t se tomaron 50 µL de muestra que se mezclaron con 50 µL de DNS y se continuó con el procedimiento antes descrito para determinación de azúcares reductores.

Todo el proceso se repitió para tiempos t de 5, 15 y 30 minutos.

9.1.2.4 Evaluación de la relevancia de preincubar a AmyA en la mezcla de reacción antes de agregar el sustrato.

Para el tiempo de reacción de 30 minutos, se evaluaron las composiciones de disolventes descritas en el inciso anterior para 2 condiciones:

Reacción con preincubación: Se siguió el método descrito en la sección 9.1.2.3

Reacción sin preincubación: 20 µL de sobrenadante fueron adicionados a 200 µL de la mezcla de reacción con almidón al 1% precalentada por 10 min. Transcurridos 30 minutos de reacción se tomaron 50 µL de muestra para determinar azúcares reductores por el método de DNS.

9.1.2.5 Efecto sobre AmyA de la concentración de butanol entre 10 y 15%

Se prepararon por triplicado 200 μL de mezclas de solución amortiguadora Tris 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7 con MeCN al 18% (fracción molar: 0.11 a 0.13) y concentraciones variables de butanol (10, 11, 12, 13, 14, 15% que corresponden a las concentraciones molares 0, 0.83, 1.67, 2.50, 3.34 o 4.17 M) y almidón al 1%. Se agregaron 20 μL de mezcla enzimática a la mezcla de reacción con almidón al 1% precalentada por 10 min. Transcurridos 5 minutos de reacción se tomaron 50 μL de muestra y se mezclaron con 50 μL de DNS.

El procedimiento se repitió para mezclas de reacción de 15 y 30 minutos.

9.1.3 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en medio sólido con butanol-acetonitrilo en la actividad amilolítica de AmyA

9.1.3.1 Actividad amilolítica de AmyA en medio sólido

Se probaron 3 condiciones para medir la actividad de la α -amilasa en colonias:

1. Sembrado de las células transformadas en medio sólido LB/ampicilina, almidón al 1%, con incubación a 37 °C por 12 horas.
2. Sembrado de las células transformadas en medio sólido LB/ampicilina, almidón al 1% e IPTG 1 mM, con incubación a 37 °C por 12 horas.
3. Sembrado de las células transformadas en una caja Petri con un medio compuesto de LB/ampicilina (**Placa A**), e incubado a 37 °C por 12 horas. Seguido de transferencia de las colonias a medio sólido LB/ampicilina, almidón al 1% e IPTG 1 mM (**Placa B**), con incubación de 12 horas.

Las pruebas se realizaron en cajas Petri de vidrio estériles. Terminado el proceso para las tres pruebas, las cajas se calentaron a 72 °C en un horno y a cada una se le adicionó yodo-yodurado con una concentración de yodo 13 mg/mL.

9.1.3.2 Relación del efecto de la composición de butanol y acetonitrilo en medio sólido con el de la mezcla acuosa

Posteriormente a la transformación de células ER electrocompetentes, con el vector conteniendo el gene de AmyA se sembraron en placas de LB/ampicilina (**Placas A**). Después de 12 horas de crecimiento a 37 °C, las colonias se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se colocó en una placa de LB/ampicilina/IPTG (**Placas B**), donde las colonias crecieron a 37 °C por 18 h. Pasado este tiempo se lisaron las células con vapores de cloroformo colocando un papel impregnado con cloroformo dentro de la caja. Finalizada esta operación, la membrana se cortó en 4 pedazos y cada uno fue colocado en una caja Petri de vidrio donde se cubrió con una capa de papel remojado en una mezcla acuosa de butanol-acetonitrilo, usando una concentración de acetonitrilo al 18% (fracción molar de 0.12) y butanol al 10, 11, 12 o 13% (correspondientes a 1.67, 1.84, 2.00, 2.17, 2.34 y 2.50 M). Sobre éste, se vertieron 15 mL de una mezcla de agarosa con almidón, 18% de acetonitrilo y la concentración de butanol correspondiente a la usada para remojar el papel (**Placas C**). Para preparar la mezcla de agarosa y almidón con disolventes orgánicos se vertieron los volúmenes de butanol y acetonitrilo para alcanzar la concentración correspondiente de éstos en un tubo falcon de 50 mL y se adicionó una mezcla líquida de agarosa al 4.5% y almidón al 1% hasta completar 15 mL, agitando después de tapar la mezcla en un vórtex. Después de agregar esta mezcla de agarosa y almidón en las cajas Petri se dejaron solidificar. Después de taparlas, estas cajas se calentaron a 72 °C por una hora en un horno, se sacaron con cuidado del horno, se dejaron enfriar, tras lo cual se adicionó una disolución de yodo-yoduro de potasio a 13 mg/mL (**Figura 25**) a cada caja. Las colonias alrededor de las cuales se formó un halo amarillo después de la adición de yodo se identificaron como productoras de enzima funcional.

Después de agregar el yodo, los halos en cada caja, que corresponden al área donde hubo actividad amilolítica, se comparó con la actividad del sobrenadante observada en las mezclas acuosas butanol-acetonitrilo de la sección 9.1.2.5.

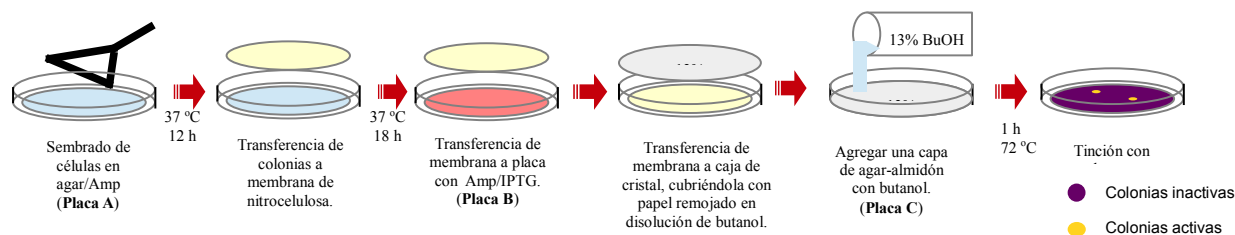


Figura 25. Pasos seguidos para el ensayo de actividad amilolítica de la enzima AmyA producida por colonias en medio sólido. Se ejemplifica la preparación de para el ensayo con butanol al 13%, estos mismos pasos se siguieron cuando la concentración de butanol fue 10, 11 y 12%. Además de butanol el papel y la mezcla de agar-almidón contenían 18% acetonitrilo.

9.1.4 Estandarización de la producción heteróloga de la enzima AmyA en cajas de 96 pozos

Los ensayos se realizaron en la cepa ER de *E. coli* después de introducir por electroporación el gen de AmyA silvestre con el péptido señal pelB que facilita la excreción de la enzima al transportarla al periplasma, en un vector pET22a (Damián-Almazo, J.Y., 2006), el cual es inducible con IPTG.

Durante su incubación, todas las cajas fueron agitadas a 150 rpm en una incubadora y se cubrieron con papel film.

9.1.4.1 Método de producción de enzima

Se usaron colonias individuales para inocular volúmenes de 500 μ L de LB suplementado con ampicilina 200 μ M en una caja de 96 pozos (**caja 1**); usando una colonia por pozo. Se incubó la caja por un tiempo t_1 de 16, 18, 20, 22 o 24 horas, según se indique, a 37 °C, después del cual se usaron 5 μ L de cada pozo para inocular volúmenes de 500 μ L de LB con ampicilina 200 μ M en una segunda caja de 96 pozos (**caja 2**) la cual se incubó a 37 °C. Después de un tiempo t_2 , de 3, 4, 5, 6, y 7 horas se indujo con 0.5 μ L de IPTG 1 M, tras lo cual se dejó en incubación hasta que transcurrió un tiempo t_3 de 24 horas a partir del tiempo de inoculación de la **caja 2**.

Transcurrido el tiempo t_3 , la segunda caja se centrifugó a 1792 g y se midió la actividad hidrolítica de 20 μ L de sobrenadante.

9.1.4.2 Medición de la actividad catalítica

Los ensayos de actividad hidrolítica se hicieron por el método de DNS descrito anteriormente en la sección 8.1.2.3. La actividad de cada muestra se reporta como la

cantidad de azúcares reductores formados tras 30 minutos de reacción en una solución conteniendo 200 μL de almidón al 1% en una solución amortiguadora de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM a pH 7 a 85 °C en un termomezclador de temperatura controlada Eppendorf sin agitación.

9.1.5 Cribado del banco de mutantes

La librería de plásmidos obtenida en la sección 9.1.1 se usó para la transformación de células electrocompetentes ER, estas células se sembraron en una placa de LB/ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las colonias resultantes se evaluaron en medio sólido siguiendo el método descrito en la sección 9.1.3.1 (**Figura 26**), usando 13% de butanol (2.17 M) y 18% de acetonitrilo (fracción molar de 0.12). Se buscaron en la **Placa A** a las colonias correspondientes a las identificadas como activas en la **Placa C**, y su actividad fue reevaluada en una mezcla acuosa de butanol-acetonitrilo como se describe a continuación.

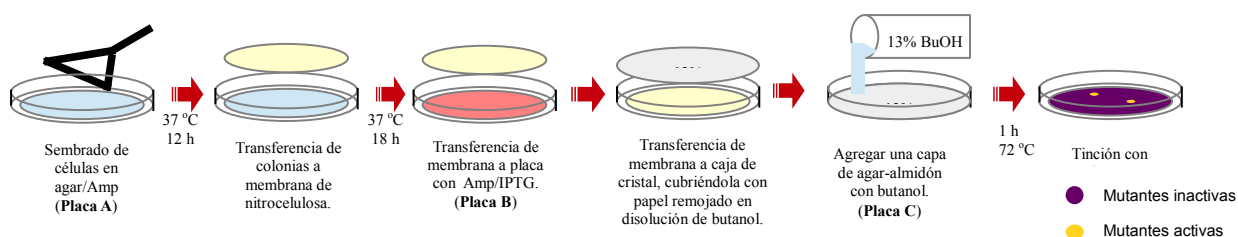


Figura 26. Pasos seguidos durante el método de selección en medio sólido.

Las colonias seleccionadas como activas en medio sólido se usaron para inocular cajas de 96 pozos con 500 μL de LB/ampicilina. Estas se cultivaron siguiendo el proceso señalado en la sección 9.1.4.1 usando tiempos de t_1 , t_2 y t_3 de 24, 6 y 24 horas respectivamente (**Figura 27**). Terminado este proceso, la caja se centrifugó a 4 000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5804 R durante 4 minutos. El sobrenadante se usó para realizar los ensayos catalíticos.

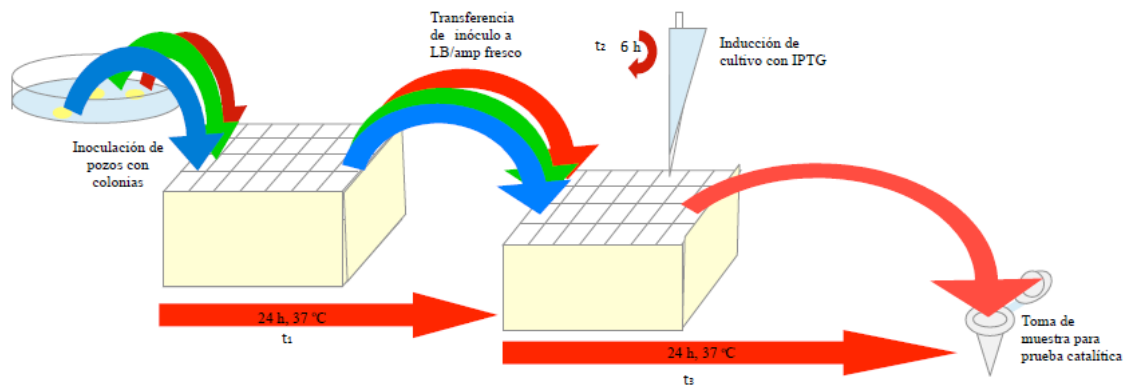


Figura 27. Proceso de producción de mezcla enzimática para tamizaje en medio líquido.

El ensayo de actividad enzimática se realizó a 85 °C en un agitador de temperatura controlada Eppendorf. Se tomaron 20 µL del sobrenadante y éstos se agregaron a 200 µL de una disolución de almidón al 1% en agua con butanol-acetonitrilo al 13 (2.17 M) y 18% (fracción molar 0.12), respectivamente, precalentados a 85 °C durante 5 minutos. Transcurrida media hora, se tomaron 50 µL de muestra y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL con 50 µL de DNS. La mezcla anterior, se calentó por 5 minutos a 85 °C en un agitador de temperatura controlada Eppendorf, se enfrió en hielo y se midió su absorbancia a 540 nm empleando un equipo Safire Tecan.

Con el fin de corroborar los resultados, la pastilla correspondiente a los pozos con mayor actividad fue usada para producir y purificar plásmido por medio del kit de purificación de plásmido Roche, y éste se secuenció. Para cada mutante identificada se transformaron por electroporación células de *E. coli* ER con el plásmido correspondiente, y se sembraron en una placa de LB/ampicilina 200 µg de ampicilina/mL de medio y se incubaron por 18 horas a 37 °C. Tres de estas colonias se usaron para inocular 3 tubos con 2 mL de medio líquido LB con ampicilina 200 µg/mL, y los cultivos se incubaron a 37 °C en una incubadora agitando a 150 rpm, induciendo cuando alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 600 nm con 2 µL de IPTG 1M, continuando la incubación a las mismas condiciones toda la noche. Los cultivos se centrifugaron a 17 000 g y la actividad del sobrenadante se evaluó como se describe en el párrafo anterior usando a la enzima silvestre de AmyA como referencia.

9.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos del capítulo 9 se basaron en la caracterización realizada para *A. niger* con metanol (Santamaría, R.I., *et al.*, 1999). En esta se observaba que la

actividad tanto hidrolítica como alcoholítica disminuían con el aumento en la concentración de metanol, la primera monotónicamente y la segunda después de un incremento en la misma. La literatura señala que esta caída en la actividad estaba asociada a una pérdida en la estructura, como se observa para la lacasa de *Polyporus versicolor* y la quimiotripsina pancreática bovina (Mozhaev, V.V., *et al.*, 1989) y recientemente para las haloalcano deshalogenasas (Stepankova, V., *et al.*, 2013); por tanto, sugerimos que la estabilidad de AmyA es el límite para continuar aumentando la actividad alcoholítica de AmyA con la concentración de alcohol.

El método de selección debe permitir encontrar a las variantes de la enzima silvestre con las características deseadas en el menor tiempo posible y con el menor esfuerzo para poder analizar el mayor número de variantes posibles. Por ello, el método de selección desarrollado en esta tesis se dividió en 2 partes: detección de colonias productoras de mutantes activas en medio sólido, y evaluación de variantes activas en mezclas de agua-disolvente orgánico.

9.2.1 Generación de un banco de mutantes de AmyA de *Thermotoga maritima*

Se obtuvo una librería de 50 000 mutantes, con una tasa de mutación promedio de 0.82% (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de mutagénesis en el banco de mutantes de AmyA. El porcentaje de mutagénesis promedio fue de 0.82 %. Los datos fueron analizados usando el programa Serial Cloner.

| Mutante | Cantidad de nucleótidos secuenciados | Cantidad de nucleóticos mutados | Cantidad de aminoácidos mutados | % Mutagénesis nucleótidos |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | 878 | 8 | 6 | 0.91 |
| 2 | 717 | 10 | 9 | 1.39 |
| 3 | 638 | 3 | 3 | 0.47 |
| 4 | 533 | 3 | 2 | 0.56 |
| 5 | 262 | 2 | 1 | 0.76 |

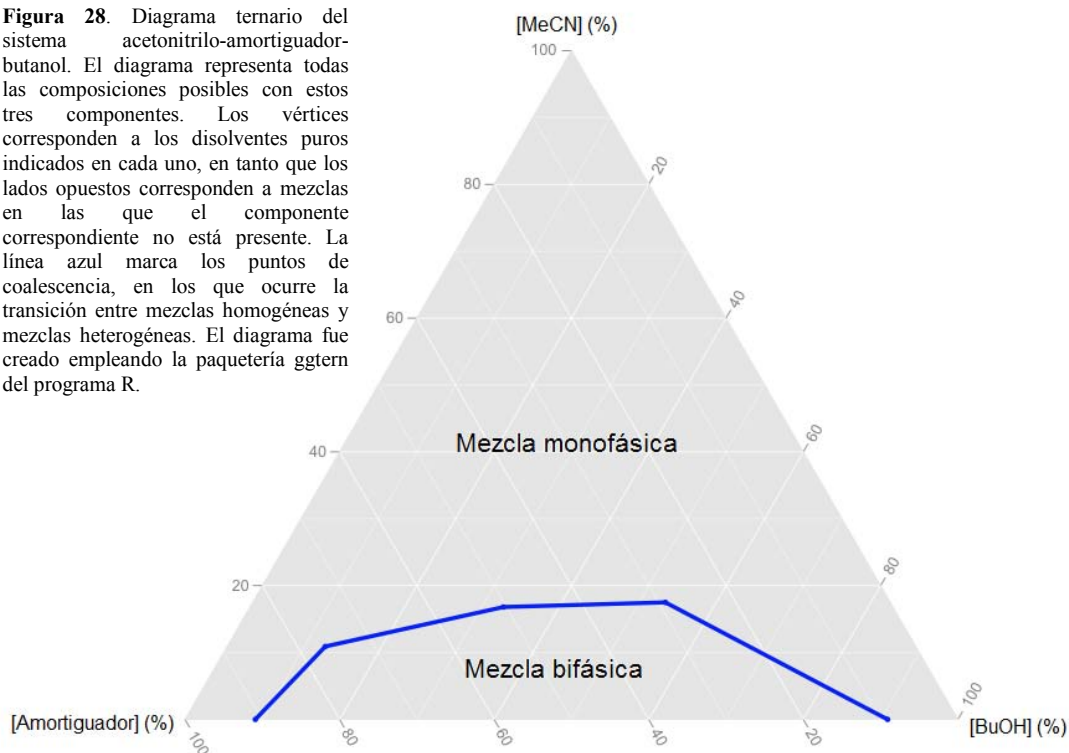
9.2.2 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en mezclas acuosas de butanol-acetonitrilo en la actividad hidrolítica de AmyA

La identificación de variantes de AmyA más estables que la enzima silvestre en mezclas acuosas butanol-acetonitrilo requiere definir primero la estabilidad de la enzima silvestre. Por ello, se obtuvo un perfil de actividad de AmyA para la reacción de hidrólisis para usarlo como indicador de la concentración máxima tolerada por la enzima.

9.2.2.1 Determinación del diagrama de fases de la mezcla butanol-agua-acetonitrilo a temperatura ambiente

Para incrementar la concentración de butanol arriba de su límite de solubilidad en agua manteniendo una sola fase, se adicionó acetonitrilo como cosolvente. Para saber que concentración de acetonitrilo se requería para disolver el butanol se trazó el diagrama de fases usando los datos obtenidos por titulación volumétrica (**Figura 28**). Éste muestra que usando una concentración de aproximadamente 18% de acetonitrilo se logra miscibilidad completa de butanol para todas las proporciones usadas.

Figura 28. Diagrama ternario del sistema acetonitrilo-amortiguador-butanol. El diagrama representa todas las composiciones posibles con estos tres componentes. Los vértices corresponden a los disolventes puros indicados en cada uno, en tanto que los lados opuestos corresponden a mezclas en las que el componente correspondiente no está presente. La línea azul marca los puntos de coalescencia, en los que ocurre la transición entre mezclas homogéneas y mezclas heterogéneas. El diagrama fue creado empleando la paquetería ggtern del programa R.



9.2.2.2 Efecto de la concentración de butanol en la estabilidad de AmyA

Se seleccionó 18 % de acetonitrilo (fracción molar 0.12) como la cantidad mínima que asegura una completa miscibilidad en todo el espectro de concentraciones de butanol-agua. Manteniendo constante la cantidad de acetonitrilo (18%), se evaluó el efecto de incrementar la cantidad de butanol en la mezcla de reacción, en la actividad hidrolítica del extracto (**Figura 29**). Estas mediciones se realizaron incubando a la enzima 5 minutos en el medio de reacción antes de agregar el sustrato. Al aumentar la concentración de butanol la actividad enzimática se mantiene casi constante, pero al sobrepasar el 10% de butanol (1.67 M) se pierde la actividad.

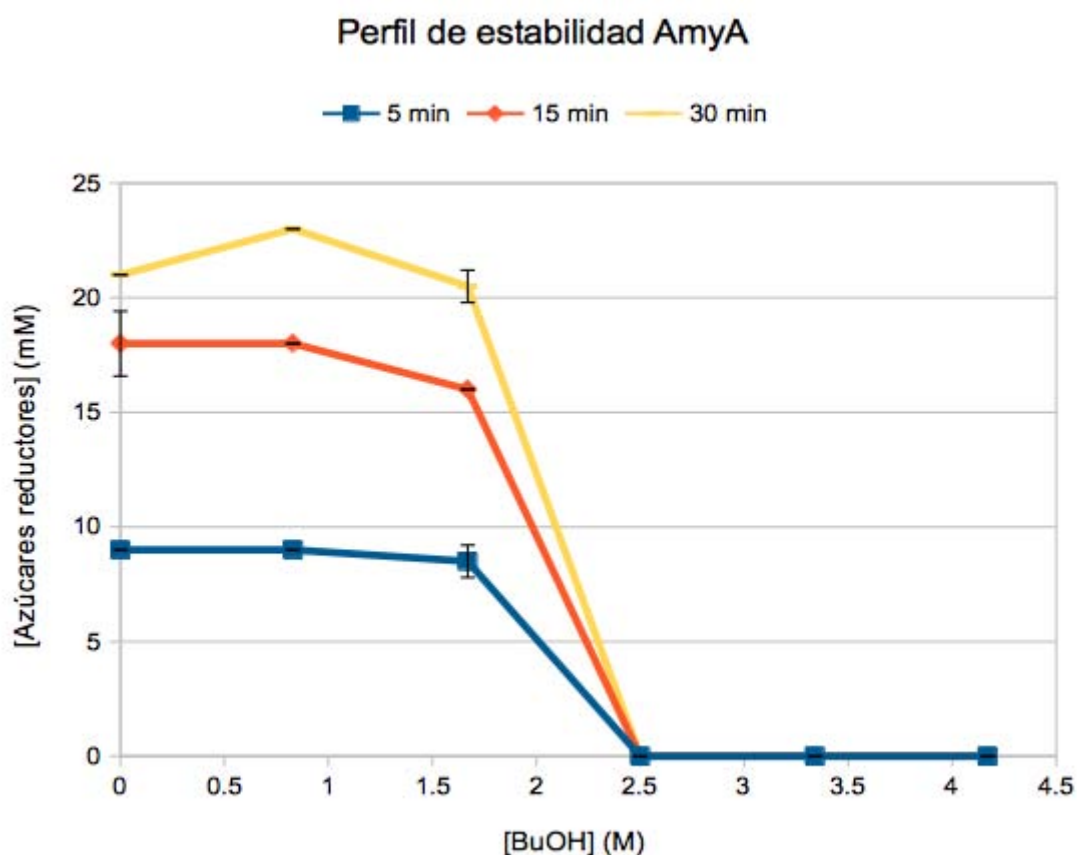


Figura 29. Efecto del butanol en la producción de productos de hidrólisis de AmyA. Se evaluó la producción de azúcares reductores a partir de almidón al 1 %. después de 5 (curva azul), 15 (curva anaranjada) y 30 minutos (curva amarilla) de reacción para todas las composiciones. El sobrenadante con AmyA se incubó por 5 minutos antes de agregar el sustrato. Todas las mezclas contenían 18% de acetonitrilo.

9.2.2.3 Evaluación de la relevancia de preincubar a AmyA en la mezcla de reacción antes de agregar el sustrato.

Ya que la actividad hidrolítica se usó como marcador de la actividad, se agregó una etapa de incubación en la mezcla acuosa butanol-acetonitrilo antes de agregar el

sustrato, cuya adición inicia la reacción, para minimizar la selección de enzimas más hidrolíticas en lugar de aquellas con mayor estabilidad. Sin embargo, este paso aumentaba el tiempo del análisis por muestra, por lo que fue importante evaluar si este paso era necesario. Obteniendo el perfil de estabilidad de AmyA con incubación y sin incubación de AmyA se observa que estos dos eran muy parecidos, perdiéndose en ambos casos la actividad enzimática a más de 10% de butanol, correspondientes a 1.67 M (**Figura 30**). Por lo que se decidió realizar el tamizaje sin preincubar a AmyA en una mezcla acuosa de butanol-acetonitrilo antes de adicionar al almidón.

Perfil de estabilidad de AmyA en Butanol

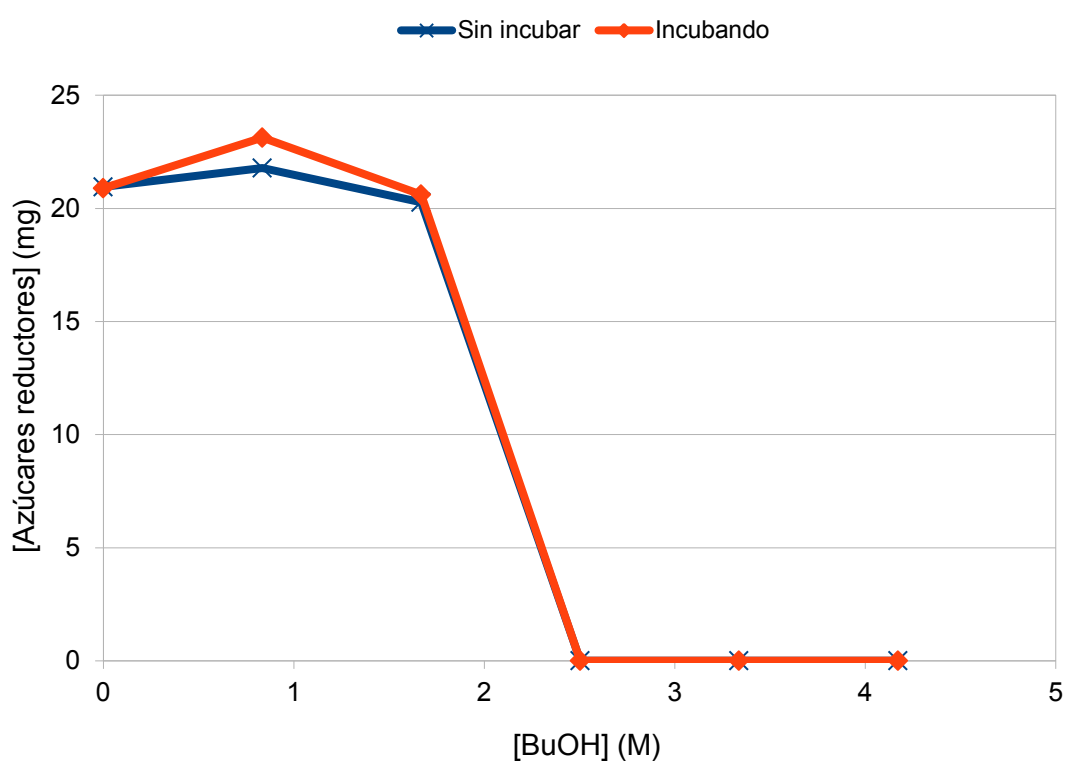


Figura 30. Efecto del butanol en la producción de productos de hidrólisis de AmyA. Se evaluó la producción de azúcares reductores a partir de almidón al 1 % incubando el sobrenadante 5 minutos antes de adicionar el sustrato (curva anaranjada) y sin incubar (curva azul). Todas las mezclas contenían 18% de acetonitrilo. Se midió la producción de azúcares reductores después 30 minutos de reacción para todas las composiciones.

9.2.2.4 Efecto sobre AmyA de la concentración de butanol entre 10 y 15%

Se refinó el perfil de actividad en butanol-acetonitrilo obteniendo los valores para concentraciones entre 10 y 15% de butanol (1.67-2.50 M). La actividad de la enzima se pierde abruptamente para valores mayores a 12% de butanol (2.00 M)

(Figura 31).

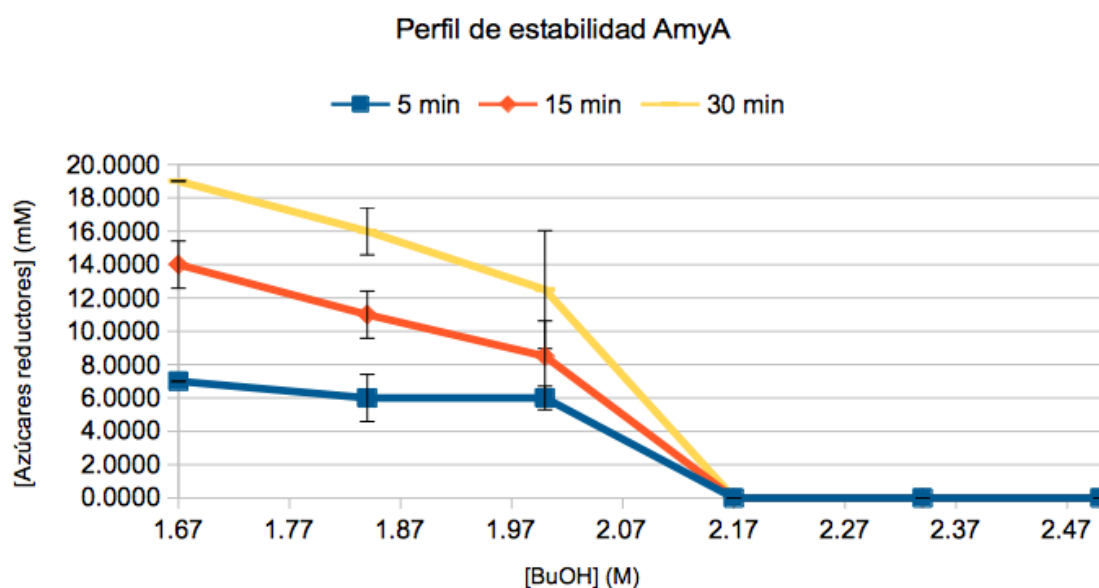


Figura 31. Efecto del butanol en la producción de productos de hidrólisis de AmyA. Se evaluó la producción de azúcares reductores a partir de almidón al 1 %. Después de 5 (curva azul), 15 (curva anaranjada) y 30 minutos (curva amarilla) de reacción para todas las composiciones. El sobrenadante con AmyA se agregó directamente a la mezcla con el sustrato. Todas las mezclas contenían 18% de acetonitrilo.

9.2.3 Evaluación del impacto de la concentración de butanol en medio sólido con butanol-acetonitrilo en la actividad amilolítica de AmyA

Se evaluó la capacidad de AmyA para degradar el almidón (actividad amilolítica) en medio sólido mediante la adición de una disolución de yodo-yodurado con una concentración de yodo de 13 mg/mL. Este reactivo se usó en los ensayos con y sin disolventes orgánicos, ya que el yodo, de color rojizo, forma un complejo azul marino con el almidón. El montaje de la técnica se realizó empleando a la enzima silvestre de AmyA, la cual se consideró activa en todos los casos en ausencia de disolventes orgánicos, considerando que la ausencia de actividad se debía a problemas de expresión y secreción de AmyA. Cuando se emplearon disolventes orgánicos, la falta de actividad se atribuyó a la desestabilización de AmyA por los disolventes.

9.2.3.1 Actividad amilolítica de AmyA en medio sólido

Cuando se sembraron las bacterias en medio sólido LB con almidón, IPTG y ampicilina (condición 2) no hubo crecimiento bacteriano. La funcionalidad enzimática de la proteína producida bajo las otras dos condiciones (1 y 3) se analizó agregando la

disolución de yodo-yodurado.

Bajo la condición 1, en la que se sembraron las bacterias en medio sólido con almidón y ampicilina, pero sin IPTG, hubo crecimiento de colonias aisladas, pero no se detectó actividad enzimática tras 12 horas de incubación a 72 °C, con o sin lisado celular, antes del calentamiento. Esto se atribuyó a una concentración insuficiente de AmyA para la prueba cuando su producción no se inducía con IPTG. Ya que si este inductor estaba presente desde el sembrado de las colonias, no se observaba crecimiento bacteriano se buscó cultivar las células antes de su inducción.

Por ello, en la condición 3, el crecimiento de las colonias se llevó a cabo en dos etapas: crecimiento de colonias en medio sólido LB/ampicilina; transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa para su estimulación en una placa con IPTG. En esta condición, después de agregar a la membrana la mezcla con almidón e IPTG con agar, dejar incubar por 12 horas a 37 °C, y calentar por una hora a 72 °C, se observaron colonias activas en la caja. (**Figura 32**).



Figura 32. Imagen de una caja después de procesarse bajo la condición 3. El color violeta indica la presencia de almidón, ésta sólo desaparece cuando la α -amilasa lo hidroliza (zonas amarillas claras).

9.2.3.2 Relación del efecto de la composición de butanol y acetonitrilo en medio sólido con el de la mezcla acuosa

Para demostrar que el ensayo en placa reflejaba lo observado en la prueba en líquido, se realizó esta prueba empleando concentraciones de 10, 11, 12 y 13% de butanol, manteniendo fija la concentración de acetonitrilo de 18% (**Figura 33**). Se observó que en las cajas, el área donde el almidón fue degradado, la cual no fue teñida azul por el yodo, disminuye al incrementarse la concentración de butanol en la caja; reflejando que al igual que en medio líquido, la actividad de la enzima disminuye al aumentar la concentración de butanol. La tinción con yodo es casi completa para la caja con concentración de butanol de 13 %, concentración a la que en la mezcla acuosa se pierde la actividad de AmyA.

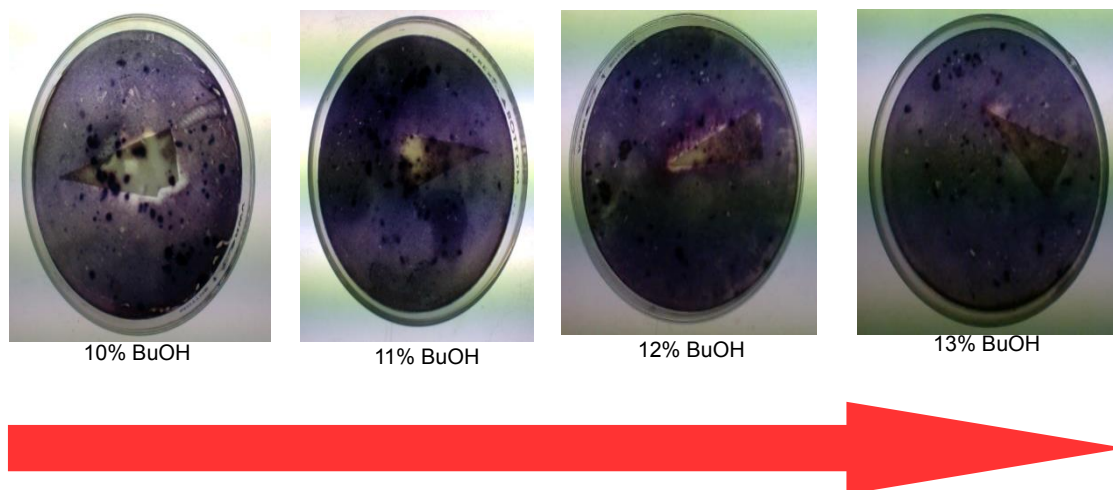


Figura 33. Apariencia de las placas C, después de teñir con yodo, empleando diferentes concentraciones de butanol. Se observa que al igual que en el ensayo en líquido, la actividad cae conforme se aumenta la concentración de butanol

9.2.4 Estandarización de la producción heteróloga de la enzima AmyA en cajas de 96 pozos

Era deseable encontrar las mejores condiciones para producir a la enzima cuya actividad se mediría en mezclas butanol-acetonitrilo. Estas condiciones debían asegurar la mayor producción posible de enzima, asegurando que ésta fuera lo más homogénea posible, minimizando la variación para todas las colonias bajo análisis. Por ello se maximizó la cantidad de proteína producida para asegurar que los límites de detección del método estuvieran impuestos por la estabilidad de la enzima y no por su producción; la variación se minimizó para que las diferencias de estabilidad observadas fueran debido a la tolerancia de la enzima a disolventes orgánicos y no a una variación en su expresión.

Se midió la actividad hidrolítica en agua para valorar la producción de enzima porque la actividad relativa entre las muestras se traduce en concentración relativa de proteínas en las muestras.

9.2.4.1 Método de producción de enzima

Se probaron tiempos de 16, 18, 20, 22 y 24 horas para el tiempo de incubación del preinóculo t_1 , por triplicado, manteniendo constantes el tiempo transcurrido antes de inducir con IPTG, t_2 , y el tiempo total de incubación t_3 , a 8 y 24 horas, respectivamente. Al aumentar el tiempo de preincubación la desviación estándar de la concentración de azúcares reductores medida disminuyó en las muestras. Así para t_1 igual a 24 horas se obtuvo la menor variación posible entre muestras; aunque el valor promedio de producción de azúcares para este tiempo fue el menor, fue comparable a los valores obtenidos para otros tiempos al considerar la desviación estándar. (Figura 34).

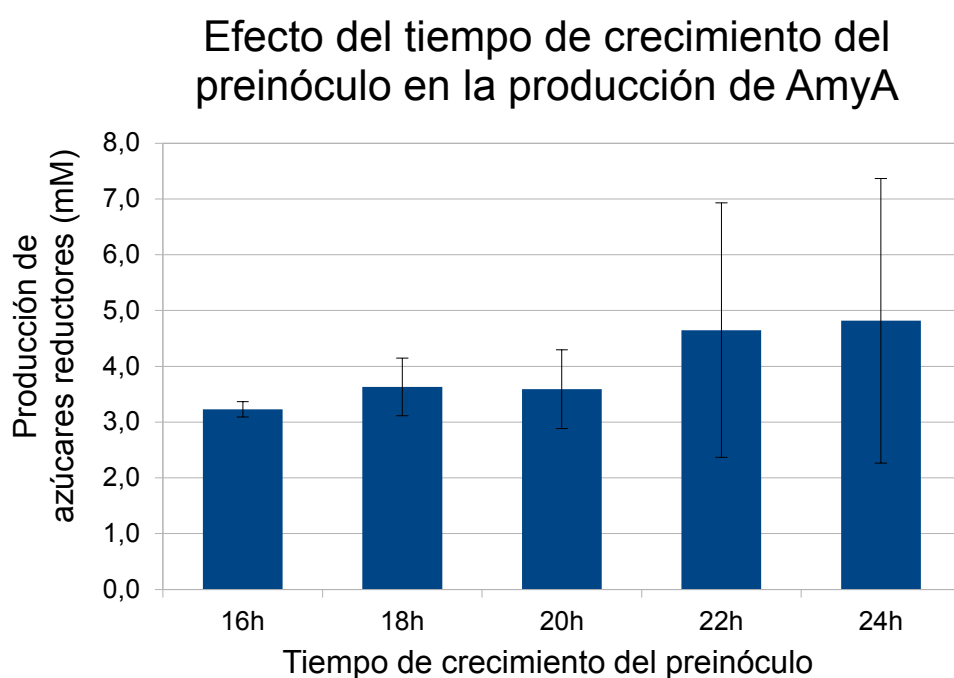


Figura 34. Efecto del tiempo de incubación del preinóculo en la producción de enzima AmyA. La cantidad de enzima en el sobrenadante es proporcional a la actividad observada. Se incubó la caja durante 8 horas a 37 °C antes de inducir, dejándola un tiempo total de incubación de 24 horas a la misma temperatura.

Considerando los resultados anteriores, se realizó por quintuplicado de nuevo el experimento manteniendo constante ahora el tiempo de incubación del preinóculo, así como el tiempo de incubación total de la **caja 2**, t_3 , ambos a 24 horas, variando el tiempo de inducción, t_2 , con valores de 3, 4, 5, 6 y 7 h. Se observó al incrementar el tiempo transcurrido antes de inducir con IPTG, se incrementó la producción de azúcares reductores, sin embargo, la desviación estándar de la concentración de azúcares reductores medida también aumentó, con la excepción del cultivo correspondiente a 6 horas, para el cual la desviación estándar era más pequeña que la medida para los

cultivos inducidos después de 5 o 7 horas (Figura 35). Los valores producción de azúcares reductores medidos para estos ensayos superaron a los obtenidos usando 8 horas de incubación antes de la inducción, que corresponden al tiempo de inducción del ensayo anterior (Figura 34). Así, al seleccionar el tiempo de incubación de 6 horas antes de la inducción nos aseguramos que la producción de azúcares reductores con AmyA sería la más alta posible, minimizando al mismo tiempo la variación.

Efecto del tiempo de inducción en la producción de AmyA

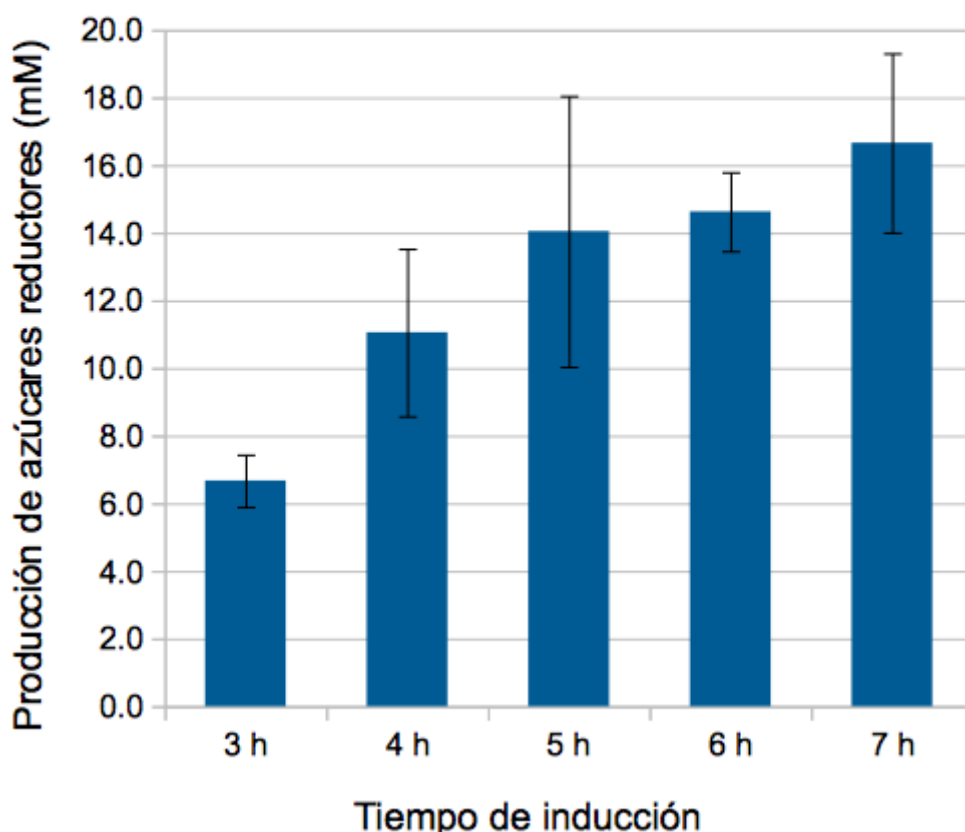


Figura 35. Efecto del tiempo de inducción en la producción de enzima AmyA. La cantidad de enzima en el sobrenadante es proporcional a la producción de azúcares reductores. El tiempo de incubación de los preinóculos fue de 24 horas, así como el tiempo de total de incubación de la segunda caja. Para cada tiempo se usó un par de cajas independientes a los otros, tanto para el preinóculo como para la caja de donde se obtuvo el sobrenadante para la prueba catalítica para minimizar la variación.

Para el tiempo de incubación total de la **caja 2** se seleccionó el tiempo de 24 horas, ya que, se obtuvieron buenos resultados y éste correspondía también al mejor tiempo de incubación para el preinóculo.

9.2.5 Cribado del banco de mutantes

Se muestrearon alrededor de 30 000 mutantes del banco en placas, analizando entre 400 y 1000 mutantes por caja. Como se indica en la metodología, la selección se llevó a cabo después de la tinción con yodo seleccionándose en la **Placa A** aquellas colonias que aparecen de color amarillo en la **Placa C** (**Figura 36**). La selección se llevó a cabo usando 13% de butanol (2.17 M) y 18% de acetonitrilo (fracción molar 0.12).

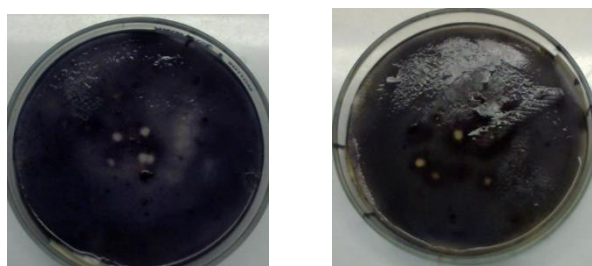


Figura 36. Aspecto típico de **Placas C** después de tinción con yodo con mutantes activos bajo la condición de screening.

Las colonias seleccionadas para su análisis en medio líquido fueron 85 y de éstas, 3 mostraron actividad en la condición de tamizaje. Al expresar a los mutantes identificados a partir de células *E. coli* ER recién transformadas por electroporación su estabilidad en la mezcla de reacción evaluada no pudo confirmarse, lo que hace pensar que se trataba de un falso positivo. Dado que se hicieron las pruebas usando a la enzima silvestre de AmyA como control negativo, como se señala en la sección 9.1.5, los mutantes más inestables que AmyA silvestre sólo pudieron mostrar mayor actividad si tuvieron una concentración mayor en el sobrenadante. Esta conclusión se refuerza al analizar las mutaciones en las variantes encontradas (**Tabla 6**). Dos de las mutantes encontradas (3b y 3M) presentan mutaciones silenciosas dos de las cuales comparten. Dichas mutaciones incluyen la sustitución de codones por codones con menor abundancia: AAC (0.61) por AAT (0.39) para N75; y ACA (0.30) a ACG (0.23) para T17. La tercer mutante (2b) presenta la sustitución P215A, lo que podría facilitar el plegamiento de AmyA ya que la prolina ha reducido la velocidad de plegamiento de algunas proteínas (Wu, Y., Matthews, C.R., 2002).

Tabla 6. Mutaciones en las variantes de AmyA identificadas como más estables en butanol. +Abundancia referida a una fracción total de 1. *Datos obtenidos de <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/in-vitro-genetics/codon-usage.html>

| Mutante | Mutaciones | Cambio de codón (silvestre->mutante) | Abundancia del codón dentro de los codones para el mismo aminoácido*+ (silvestre->mutante) | Uso del codón en 100 codones* (silvestre->mutante) |
|---------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 2b | P215A | (CCC->GCC) | (0.10->0.25) | (0.4%->2.3%) |
| 3b | N75 S508 | (AAC->AAT) (TCA->TCG) | (0.61->0.39) (0.12->0.13) | (3.8%->1.6%) (0.7%->0.8%) |
| 3M | T17 N75 S508 | (ACA->ACG) AAC->AAT (TCA->TCG) | (0.30->0.23) (0.61->0.39) (0.12->0.13) | (0.1%->1.3%) (3.8%->1.6%) (0.7%->0.8%) |

La confirmación de clonas positivas es muy importante en los métodos de evolución dirigida, pues la tasa de falsos positivos suele ser alta. Aunque la evolución dirigida parte de la base de ejercer una presión selectiva única, se lleva a cabo en sistemas biológicos, en los se conjuntan factores complejos y difíciles de controlar. En un momento dado la mayor producción de una proteína en una colonia particular puede llevar a la conclusión errónea de que dicha clona esté produciendo una enzima más activa. En el caso que nos compete existe una diferencia en el método que estamos empleando para la primera selección (en medio sólido) con el que utilizamos para la confirmación. Y como lo indica Frances Arnold “Uno obtiene lo que uno selecciona” (Schmidt-Dannert, C., Arnold, F.H., 1999). En el método en placas estamos utilizando yodo-yodurado para ver la actividad, por lo que vemos es la desaparición del almidón. Mientras que en la confirmación en medio líquido estamos utilizando la determinación de azúcares reductores que mide actividad hidrolítica.

Desafortunadamente estos experimentos los realizamos cronológicamente antes a los realizados en el capítulo anterior por lo que no se realizaron los experimentos con DMSO. En el capítulo de *Incremento de la actividad alcoholítica mediante ingeniería*

del disolvente, pudimos observar que aunque la actividad hidrolítica se pierde conforme la concentración de alcohol aumenta, la alcoholítica se incrementa antes de bajar, y en el caso del DMSO permanece a concentraciones más altas que la de hidrólisis, por lo que podemos decir que un mejor criterio para evaluar la estabilidad de los mutantes de AmyA es la medición de su actividad total medido como coloración del almidón con yodo, en donde lo que se evalúa es la desaparición del almidón independientemente de la reacción se esté llevando a cabo. Así que es posible que otras mutantes obtenidas sean más estables en la mezcla de disolventes evaluada, pero las descartamos simplemente porque eran menos hidrolíticas, al utilizar la determinación de azúcares reductores como medida de la estabilidad enzimática.

Además, dado que AmyA produjo mejores resultados empleando DMSO como cosolvente, sería conveniente repetir el proceso de tamizaje empleando un sistema con DMSO en lugar de MeCN.

Se creó una metodología para seleccionar una mayor resistencia a disolventes orgánicos de enzimas hipertermófilas expresadas en un organismo mesófilo. Este método puede mejorarse si se emplea yodo para detectar la actividad enzimática de la α -amilasa como criterio de selección en todas sus etapas, para evitar la selección de enzimas estables basada en su capacidad hidrolítica. Este método tiene el potencial de ser ajustado a nuevas composiciones en el medio. En el caso de AmyA, es recomendable usar un sistema con DMSO como medio de selección al seleccionar mutantes, ya que éste resultó ser un muy buen cosolvente para esta enzima.

10. Conclusiones

La producción de butil glicósidos mediante AmyA depende de la concentración de butanol en la mezcla de reacción; tanto en los medios de reacción con cosolvente, como en los que no lo tienen. Sin embargo, al igual que para otras α -amilasas estudiadas, el incremento en la producción de butil glicósidos con el aumento de la concentración de butanol tiene un límite, probablemente impuesto por la estabilidad de la enzima en el disolvente.

Los cosolventes permiten la catálisis con AmyA en una sola fase usando concentraciones de butanol que superan su solubilidad en agua. Lo que resultó en un aumento del 24% en la producción de butil glicósidos, y una selectividad hacia la reacción de alcoholólisis tres veces mayor a la obtenida en el límite de solubilidad del butanol cuando se utilizó DMSO.

La actividad hidrolítica no es la mejor actividad a medir cuando se desea incrementar la estabilidad de AmyA, con miras a incrementar su actividad alcoholítica; el yodo parece ser una mejor herramienta para detectar la actividad enzimática sobre almidón en este caso.

11. Perspectivas

- Realizar un estudio similar empleando alcoholes de cadena más larga como hexan-1-ol y octan-1-ol.
- Investigar los mecanismos por los que los enlaces O-glucosídicos con el butanol parecen estarse hidrolizando a tiempos de reacción largos (24 h).
- Reanalizar los bancos de mutantes generadas utilizando como mezcla de reacción el sistema de DMSO con butanol y midiendo sólo la desaparición de almidón.

12. Referencias

- Ballschmiter**, M., Fütterer, O., Liebl, W. (2006) Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline α -Amylase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3), 2206-2211.
- Baltzer**, D. (1991) Alkylpolyglucosides, their physico-chemical properties and their uses. *Tenside Surf. Det.* (8) 419-427.
- Bellot**, J.C., Choisnard, L., Castillo, E., Marty, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enz. Microb. Technol.*, 28(4-5) 362-369.
- Bordusa**, F. (2002) Proteases in Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, 102(12) 4817-4867.
- Breton**, C., Fournel-Gigleux, S., Palcic, M.M. (2012) Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 22(5) 540-549.
- Brzozowski**, A.M., Davies, G.J. (1997) Structure of the *Aspergillus oryzae* α -Amylase Complexed with the Inhibitor Acarbose at 2.0 Å Resolution. *Biochem.*, 36(36) 10837-10845.
- Cadwell**, R.C., Joyce, G.F. (1994) Mutagenic PCR. *Genome Res.* 3(6) S136-S140.
- Carrea**, G., Riva, S. (2000) Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angew. Chemie Int. Ed.*, 39(13) 2226-2254
- Chen**, K., Arnold, F.H. (1993) Tuning the Activity of an Enzyme for Unusual Environments: Sequential Random Mutagenesis of Subtilisin E for Catalysis in Dimethylformamide, PNAS, 90(12) 5618-562.
- Damián Almazo**, J.Y. (2006) *Generación de mutantes de α -amilasa de *Thermotoga maritima* con una actividad alcoholítica incrementada* (Tesis de maestría) Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Damián-Almazo**, J.Y., Moreno, A., López-Munguía, A., Soberón, X., González-Muñoz, F., Saab, G. (2008) Enhancement of the Alcoholic Activity of α -Amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by Site-Directed Mutagenesis. *Appl. Env. Microbiol.*, 74(16) 5168-5177.
- Davies**, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321(2) 557-559.
- del-Río**, G., Morett, E., Soberon, X., (1997) Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from α -amylases? *FEBS Letters*, 416(2), 221-224.
- Demchenko**, A.V. (2008) General aspects of the glucosidic bond formation. En *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*. (pp. 1-28) Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Díaz-Rodríguez**, A., Davis, B.G. (2011) Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. *Curr. Opinion Chem. Bio.*, 15(2) 211-219.
- Dickmanns**, A., Ballschmiter, M., Liebl, W., Ficner, R. (2006) Structure of the novel α -amylase AmyC from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallographica Section D*, 62(3) 262-270.
- Egorova**, K., Antranikian, G. (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opinion Microbiol.*, 8(6) 649-655.
- Fiume**, M.M., Heldreth, B., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D., Marks Jr., J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A. (2013) Safety Assessment of Decyl Glucoside and Other Alkyl Glucosides as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.*, 32(5) 22S-48S.
- Geetha**, D., Tyagi, R. (2012) Alkyl Poly Glucosides (APGs) Surfactants and Their Properties: A Review. *Tenside Surf. Det.*, 2012 49(5) 417-427.

- Ichikawa**, Y., Wang, R., Wong, C.H. (1994) Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis. *Methods Enzymol.*, 247, 107-127.
- Janecek**, S., (1997) α -amylase family: Molecular biology and evolution, *Prog. Biophys. Biol.* 67(1) 67-97
- Janecek**, S., Svensson, B., Henrissat, B. (1997) Domain Evolution in the α -Amylase Family. *J. Mol. Evol.*, 45(3) 322-331.
- Jin**, B., van Leeuwen, H.J., Patel, B., Yu., Q (1998) Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.*, 66, 201-206.
- Kim**, T.J., Park, C.S., Cho, H.Y., Kim, J.S., Lee, S.B., Moon, T.W., Kim, J.W., Oh, B.H., Park, K.H. (2000) Role of the glutamate 332 residue in the transglycosylation activity of *Thermus* Maltogenic amylase. *Biochem.*, 39(23) 6773-6780.
- Klibanov**, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001, 409(6817) 241-246.
- Kuchner**, O., Arnold, F.H. (1997) Directed Evolution of Enzyme Catalysts. *Trends Biotechnol.*, 15(12), 523-530.
- Kumar**, A., Singh, S. (2013) Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications *Crit. Rev. Biotechnol.* 33(4) 365-378.
- Larsson**, J., Svensson, D., Adlercreutz, P. (2005) α -Amylase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catalysis B: Enzym* 37(1-6) 84-87.
- Lehmann**, M., Wyss, M. (2001) Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opinion Biotechnol.* 12(4) 371-375.
- Leloir**, L.F. (1971) Two Decades of Research on Biosynthesis of Saccharides. *Science* (172) 1299.
- Liebl**, W., Stemplinger, I., Ruile, P. (1997) Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* α -amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J. Bacteriol.*, 179(3) 941-948.
- Lim**, W.J., Park, S.Y., An, C.H., Lee, J.Y., Hong, S.Y., Shin, E.C., Kim, E.J., Kim, J.O., Kim, H., Yun, H.D. (2003) Cloning and characterization of a thermostable intracellular α -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Res. Microbiol.*, 154(10) 681-687.
- Maatsura**, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M. (1984) Structure and Possible Catalytic Residues of Taka-Amylase A. *J. Biochem.*, 95(3) 697-702.
- Mahon**, E., Aastrup, T., Barboiu, M. (2010) Dynamic glycovesicle systems for amplified QCM detection of carbohydrate-lectin multivalent biorecognition. *Chem. Comm.*, 46(14) 2441-2443.
- Matsubara**, S. (1961) Studies on Taka-amylase A: VII. Transmaltosidation by Taka-amylase A. *J. Biochem.*, 49(3) 226-231.
- Matsumura**, S., Imai, K., Yoshikawa, S., Kawada, K., Uchibori, T. (1990) Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl glucosides, mannosides and galactosides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67(12) 996-1001.
- MacGregor**, E.A., Janecek, S., Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica Biophys. Acta* 1546(1) 1-20.
- Moreno**, A., Damian-Almazo, J.Y., Miranda, A., Saab-Rincón, G., González, F., Lopez-Munguía, A. (2010) Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* α -amylase. *Enzyme Microbial Tech.*, 46(5) 331-337.
- Moreno**, A., Saab-Rincón, G., Santamaría, R.I., Soberón, X., López-Munguía A. (2006) A more Efficient Starch Degradation by the Combination of Hydrolase and Transferase

- Activities of α -Amylase and Cyclomaltodextrin Glucanotransferase. *Starch/Stärke*, 56(2) 63-68.
- Mozhaev**, V.V., Benrenzin, I.V., Martinek, K. (1988) Structure-stability relationship in proteins: fundamental tasks and strategy for the development of stabilized enzyme catalysis for biotechnology. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23(3) 235-281.
- Mozhaev**, V.V., Khmelnitsky, Y.L., Sergeeva, M.V., Belova, A.B., Klyachko, N.L., Levashov, A.V, Martinek, K. (1989) Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures α -Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *FEBS*, 184(3) 597-602.
- Mutua**, L.N., Akoh, C.C. (1993) Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida* sp. Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70(1) 43-46.
- Nelson**, K. E., Clayton, R.A., Gill, St.R., Gwinn, M. L., Dodson, R.J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R.D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C., Frase, C.M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734) 323-329.
- Privé**, G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 41(4) 388-397.
- Rivera**, M.H. (2004) *Especificidad y función de la actividad de transglucosidación de la α -amilasa de Bacillus licheniformis* (Tesis de doctorado) Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Robert**, X., Haser, R., Gottschalk, T.E., Ratajcsak, F., Driguez, H., Svensson, B., Aghajari, N. (2003) The structure of barley alpha-amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs. *Structure*, 11(8) 973-984.
- Roby**, J.F., Mukerjea, R. (1994) Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.*, 251(3) 187-202.
- Rosevear**, P, VanAken, T., Baxter, J., Ferguson-Miller, S. (1980) Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 19(17) 4108-4115.
- Roy**, B., Mukhopadhyay, B. (2007) Sulfuric acid immobilized on silica: an excellent catalyst for Fischer type glycosylation. *Tet. Lett.* 48(22) 3783-3787.
- Santamaría**, R.I, el Río, G., Saab, G., Rodríguez, M.E., Soberón, X., López-Munguía, A. (1999a) Alcoholysis reactions from starch with α -amylases. *FEBS Letters*, 452(3) 346- 350
- Santamaría**, R.I., del Río, G., Saab, G., Rodríguez, M.E., Soberón, X., López-Munguía A.(1999b) Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase. *FEBS Letters*, 453(1-2) 100-106.
- Schmaltz**, R.M., Hanson, S.R., Wong, C.H. (2011) Enzymes in the Synthesis of Glycoconjugates. *Chem. Rev.* 111(7) 4259-4307.
- Schmidt-Dannert**, C., Arnold, F.H. (1999) Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol.*, 17(4) 135-136.
- Schumann**, J.K., Wrba, A., Jaenicke, R., Stetter, K.O. (1991) Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.*, 282(1) 122-126.
- Stam**, M.R., Danchin, E.G.J., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2006) Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved

functional annotations of α -amylase-related proteins. *PEDS*, 19(12) 555-562.

Stepankova, V., Damborsky, J., Chaloupkova, R. (2013) Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases. *Biotechnol. J.* 8(6) 719-729.

Summer, J.B., Howell, S.F. (1935) A Method For Determination Of Saccharase Activity. *J. Biol. Chem.*, 108, 51-54.

Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1994) Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioengineering*, 44(5) 549-556.

Ugura, G.C., Akinyauju, J.A., Sani, A. (1997) The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 46-51.

Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R. (1994) Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. *FEBS*, 222(2) 461-466.

Vihinen, M., Ollikka, P., Niskanen, J., Meyer, P., Suominen, I., Karp, M., Holm, L., Knowles, J., Mäntsälä, P. (1990) Site-Directed Mutagenesis of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Putative Role of Three Conserved Residues. *J. Biochem.*, 107(2) 267-272.

van der Marel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuisen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94(2) 137-155.

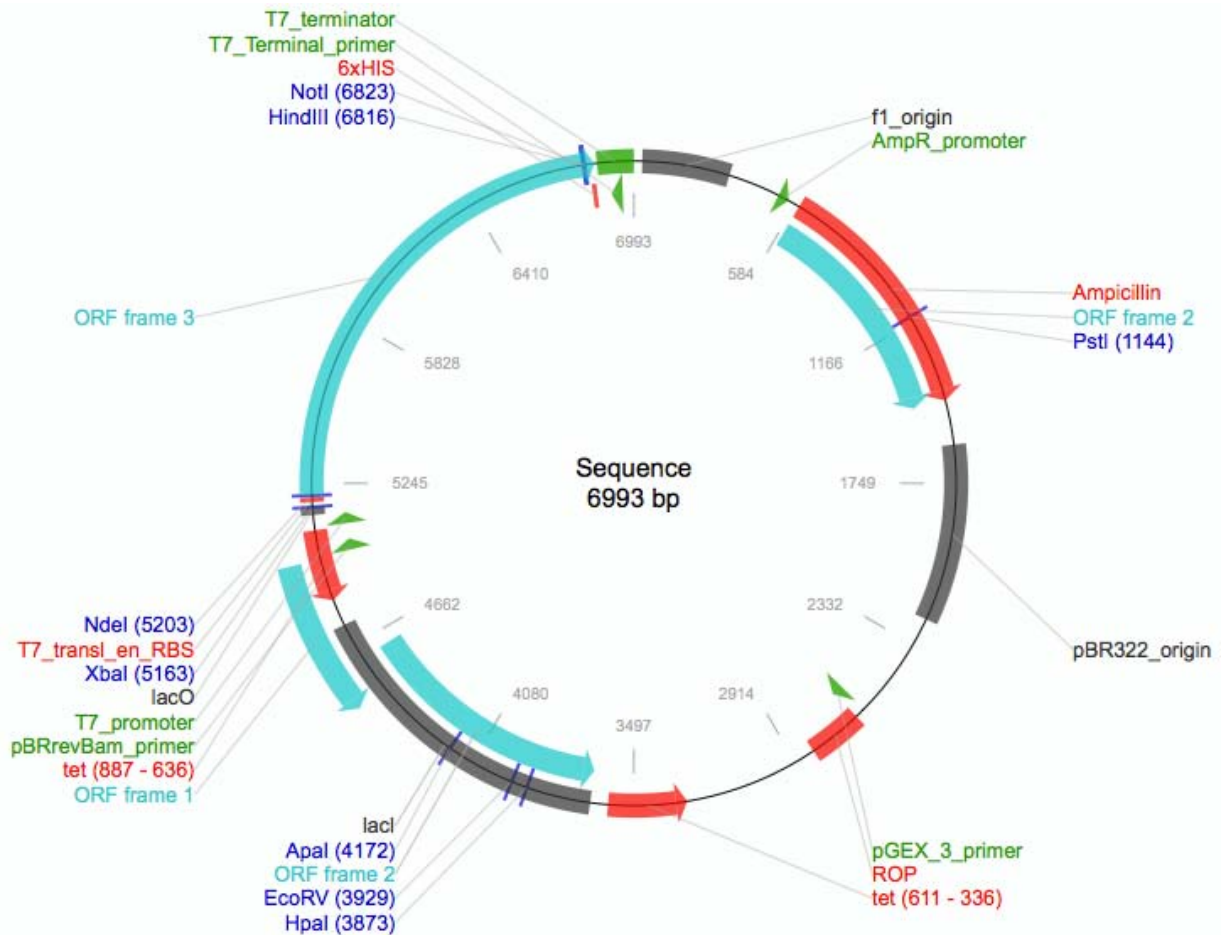
Wong, C.H., Chen, S.T., Hennen, W.J., Bibbs, J.A., Wang, Y.F., Liu, J.L.C., Pantollano, M.W., Whitlow, M., Bryan, P.N. (1990) Enzymes in organic synthesis: use of subtilisin and a highly stable mutant derived from multiple site-specific mutations. *JACS*, 112(3) 945-953.

Wu, Y., Matthews, C.R. (2002) Parallel channels and rate-limiting steps in complex protein folding reactions: prolyl isomerization and the alpha subunit of Trp synthase, a TIM barrel protein. *J. Mol. Biol.*, 323(2) 309-325.

Zeeman, S.C., Kossman, J., Smith, A.M. (2010) Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 209-234.

Zhang, Y., Thiele, I., Weekes, D., Li, Z., Jaroszewski, L., Ginalski, K., Deacon, A. M., Wooley, J., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Palsson, B., Osterman, A., Godzik, A. (2009) Three-Dimensional Structural View of the Central Metabolic Network of *Thermotoga maritima*. *Science*, 325(5947) 1544-1549.

13 Anexo I Mapa de construcción pET22/AmyA sin péptido líder y con etiqueta de histidinas construido por Damián Almazo, J.Y. (2006)



La imagen fue creada empleando el servidor Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>) para la construcción creada por Damián Almazo, J.Y., 2006. El gen de AmyA está en marco de lectura abierta 3 (ORF frame 3). A continuación se anexa la secuencia de este segmento, creado con el programa Serial Cloner V1.3:

A CAT ATG TGC TTT CAA ACG TCT ATG AGT CAA TCC CTC GTT TCA AGT AAT CCA CAT TCA AAC AGC ACA AAC ACA GAT GGT ACT AGC TCC AAC CTT GAA GAA
H M C F Q T S M S Q S L V S S N F H S N S T N T D G T S S N L E E
T GTA TAC ACG AAA GTT TGC AGA TAC TCA GTT AGG GAG CAA AGT TCA TTA GGT GTA AGT TTG TCG TGT TTG TGT CTA CCA TGA TCG AGG TTG GAA CTT CTT
5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290

GTA AAA TAC CCC GTC GTC TAC GAA ATT TTC ATT CGC TCT TTT TAC GAC AGA GAC GGG AAC GGA GTG GGA GAT TTA AAC GGT GTT TCT CAG AAA GTT GAT T
V K Y P V V Y E I F I R S F Y D R D G N G V G D L N G V S Q K V D Y
CAT TTT ATG GGG CAG CAG ATG CTT TAA AAG TAA CCG AGA AAA ATG CTG TCT CTT CCG CCT CTA AAT TTG CCA CAA AGA GTC TTT CAA CTA A
5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390

AT CTG AAG GAA CTC GGC GTT GAC GCT GTG TGG TTT ATG CCC TTC AAC GAG GCT GTT TCA TAC CAT GGA TAC GAC ATA ACA GAC TAC TAC AAC GTC GAG AA
L K E L G V D A V W F M P F N E A V S Y H G Y D I T D Y Y N V E K
TA GAC TTC CTT GAG CCG CAA CTG CGA CAC ACC AAA TAC GGG AAG TTG CTC CGA CAA AGT ATG GTA CCT ATG CTG TAT TGT CTG ATG ATG TTG CAG CTC TT
5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490

A GAC TAC GGC ACC ATG GAA GAT CTC GAA AAC ATG ATC CAG GTG CTC CAT GAG AAC GGA ATA AAG GTA ATA ATG GAT CTC GTG ATC AAC CAC ACA TCC GAT
D Y G T M E D L E N M I Q V L H E N G I K V I M D L V I N H T S D
T CTG ATG CCG TGG TAC CTT CTA GAG CTT TTG TAC TAG GTC CAG GAG TCA CTC TTG CCT TAT TTC CAT TAT TAC CTA GAG CAC TAG TTG GTC TGT AGG CTA
5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590

GAG CAT CCC TGG TTC AAA GAC GCC GTG GAA AAC ACG ACC AGC TCT CCG TAC TGG GAC TAC TAC ATA ATG AGT CTT GAA GAT CAT TCT GGT CAG GAT CAC T
E H P W F K D A V E N T T S S P Y W D Y Y I M S L E D H S G Q D H W
CTC GTA GGG ACC AAG TTT CTG CCG CAC CTT TTG TGC TGG TCG AGA GGC ATG ACC CTG ATG ATG TAT TAC TCA GAA CTT CTA GTA AGA CCA GTC CTA GTG A
5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690

GG CAC TGG AAG ATC AAC TCA AAG GGT CAA AAA GTC TGG TAT TTC GGA CTT TTT GGC TAT AAC ATG CCG GAT CTG AAC CAC GAC AGT CAG AAA GTG AGA GA
H W K I N S K G Q K V W Y F G Y M M P D L N H D S Q K V R E
CC GTG ACC TTT TAG TTG AGT TCC CCA GTT TTT CAG ACC ATA AAG CCT GAA AAA CCG ATA TTG TAC GGC CTA GAC TTG GTG CTG TCA GTC TTT CAC TCT CT
5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790

A GAA GTA AAG AAA ATC GTG GAT TTC TGG ATT TCC AAA GGT GTT GAT GGA TTC AGA ATA GAT GCT GCA AAG CAC ATA TAT GGC TGG TCC TGG GAC GAT GGG
E V K K I V D F W I S K G V D G F R I D A A K H I Y G W S W D D G
T CTT CAT TTC TTT TAG CAC CTA AAG ACC TAA AGG TTT CCA CAA CTA CCT AAG TCT TAT CTA CGA CGT TTC GTG TAT ATA CCG ACC AGG ACC CTG CTA CCC
5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890

ATA CAG GAG TCG GCC GAA TAT TTT GAA TGG TTC AGA GAT TAT GTG CTT TCC AAA AAG CCC GAT GCC ATA CTT GTG GGA GAG GTG TTC AGC AAC ACG T
I Q E S A E Y F E W F R D Y V L S K K P D A I L V G E V F S G N T Y
TAT GTC CTC AGC CCG CTT ATA AAA CTT ACC AAG TCT CTA ATA CAC GAA AGG TTT TTC GGG CTA CCG TAT GAA CAC CCT CTC CAC AAG TCG CCT TTG TGC A
5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990

AC GAT CTT TCT CTA TAT CCA ATT CCC GTT TTC AAT TTC GCC CTC ATG TAC AGT ATA AGG AAC TAC CCA GAA GGG CAG GAT GGA ATG ATA GAA AAC AAC TG
D L S L Y P I F V F N F A L M Y S I R N Y P E G Q D G M I E N N W
TG CTA GAA AGA GAT ATA GGT TAA GGG CAA AAG TTA AAG CCG GAG TAC ATG TCA TAT TCC TTG ATG GGT CTT CCC GTC CTA CCT TAC TAT CTT TTG TTG AC
6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090

G GTT GAG GAG TCT TTC CTG TTT CTT GAG AAT CAC GAT CTC CAC AGG TTC TTC TCC CAT CTT CAA GAA CAT TAC AAA AAG TTC TCC GAG TCC GAC TAC GAG
V E E S F L F L E N H D L H R F P S H L Q E H Y K K P S E S D Y E
C CAA CTC AGA AAG GAC AAA GAA CTC TTA GTG CTA GAG GTG TCC AAG AAG AGG GTA GAA GTT CTT GTA ATG TTT TTC AAG AGG CTC AAG CTG ATG CTC
6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190

TTC ATC AAA AAA COT COT GCT CTC TGG TAT TTT CTC ATA TTC ACA CTG AAA GGA TCT COT CTT ATC TAC TAC CCG COT GAA ATT GGA ACC AGA GGT TTC A
F I K K R A A L W Y F L I F T L K G S P V I Y Y G G E I G T R G F K
AAG TAG TTT TTT GCA CGA CGA GAG ACC ATA AAA GAC TAT AAG TGT GAC TTT CCT AGA GGA CAA TAG ATG ATG CCG CCA CTT TAA CCT TGC TCT CCA AAG T
6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290

AC TCC CAC COT COT CTA TAT CAC CAC CCG CTC AGA CAC CCC ATC CAC TCC TAC CCA ACC COT ACA CCA CAA COT CAA ACC TTC TCC ACA AAC CAA CTC TA
W H G P V Y D E P V R E P M Q W Y A S G T F G E G Q T F W T K E V Y
TC ACC GTG CCA GGA CAT ATA CTG CTC GGC CAC TCT CTC GGC TAC GTC ACC ATG CGT TCG CCA TGT COT CTT CCA GTT TGG AAG ACC TGT TTC CTT CAG AT
6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390

C AAA AAC GCG GGG ATA ACC TTT GGA AAC GCT GAT GTT GAC GGA TGT ATC TAT GAC GAT CCT TAC GAT GGC TTT TCT TTC GAA GAA CAG GAA AGC GAT CCG
K N A G I T F P G N A D V D G C I Y D D P Y D G F S V E E Q E S D P
G TTT TTG CCG CCC TAT TGG AAA COT TTG CGA CTA CAA CTG CCT ACA TAG ATA CTG CTA GGA ATG CTA CCG AAA AGA CAG CTT CTT GTC CTT TCG CTA GGC
6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490

AAG AGT CTT TTG AAT TTC ATC AGA TTC ATT CTC AAC TTC AGA AAA GAT CAC GAC GCC ATT TTG AAT GGA GAT CAA ACG ATC TTC AGG GAC TGG AAA AAC C
K S L L N F I R F I L N F R K D H D A I L N G D Q T I F R D W K N L
TTC TCA GAA AAC TTA AAG TAG TCT AAG TAA GAG TTG AAG TCT TTT CTA GTG CTG CCG TAA AAC TTA CCT CTA GTT TGC TAG AAG TCC CTG ACC TTT TTG G
6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590

TC ATA GCG TTC TAC AGA GAA TCC TCC AAC GAA AAG CTG TTG GTG GTC TTG AAT CCG GAT CCA GTC TGG CAA AAC AGC TTC ACT TTT GAA GAA AAC ATG AC
I A F Y R E S S N E K L L V L N P D P V W Q N S F T F E N M T
AG TAT CCG AAG ATG TCT CTT AGG AGG TTG CTT TTC GAC AAC CAC CAG AAC TTA GGC CTA GGT CAG ACC GTT TTG TCG AAG TGA AAA CTT CTT TTG TAC TG
6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690

G ATG ATT CTC GAG GTA GAT TTT GAA AAC TTC ATC TGG AAC GAG TCA AAC GTG TCT TTT TCA GCG GGT GAA TCC TTC ACT GTG GAT CCC ATG AAA CCG TAC
M I L E V D F E N F I W N E S N V S F S A G E S P T V D P M K A Y
C TAC TAA GAG CTC CAT CTA AAA CTT TTG AAG TAG ACC TTG CTC AGT TTG CAC AGA AAA AGT CCG CCA CTT AGG AAG TGA CAC CTA GGG TAC TTT CCG ATG
6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790

ATT TTC AAA AAG CTG AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT G
I F K K L K L A A A L E H H H H H * D P A A N K A R K E A E L A A
TAA AAG TTT TTC GAC TTC GAA CCG CCG COT GAG CTC GTG GTG GTG GTG GTG CTA GGC CGA CGA TTG TTT CCG GCT TTC CTT CGA CTC AAC CGA C
6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890

14 Anexo II La α -amilasa AmyA de *T. marítima* no corta el enlace O-glucosídico del butil glucósido.

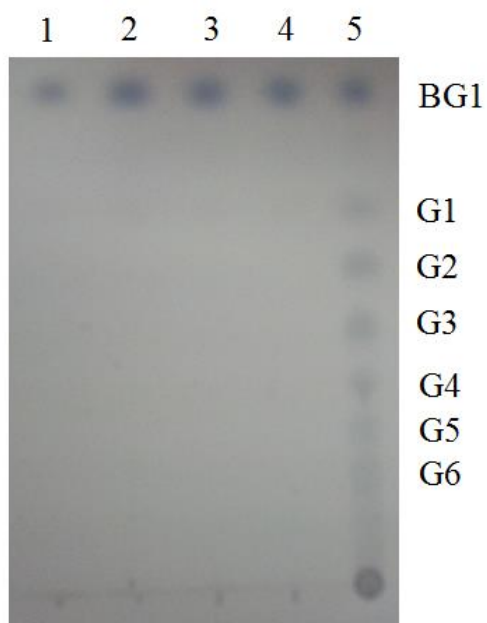
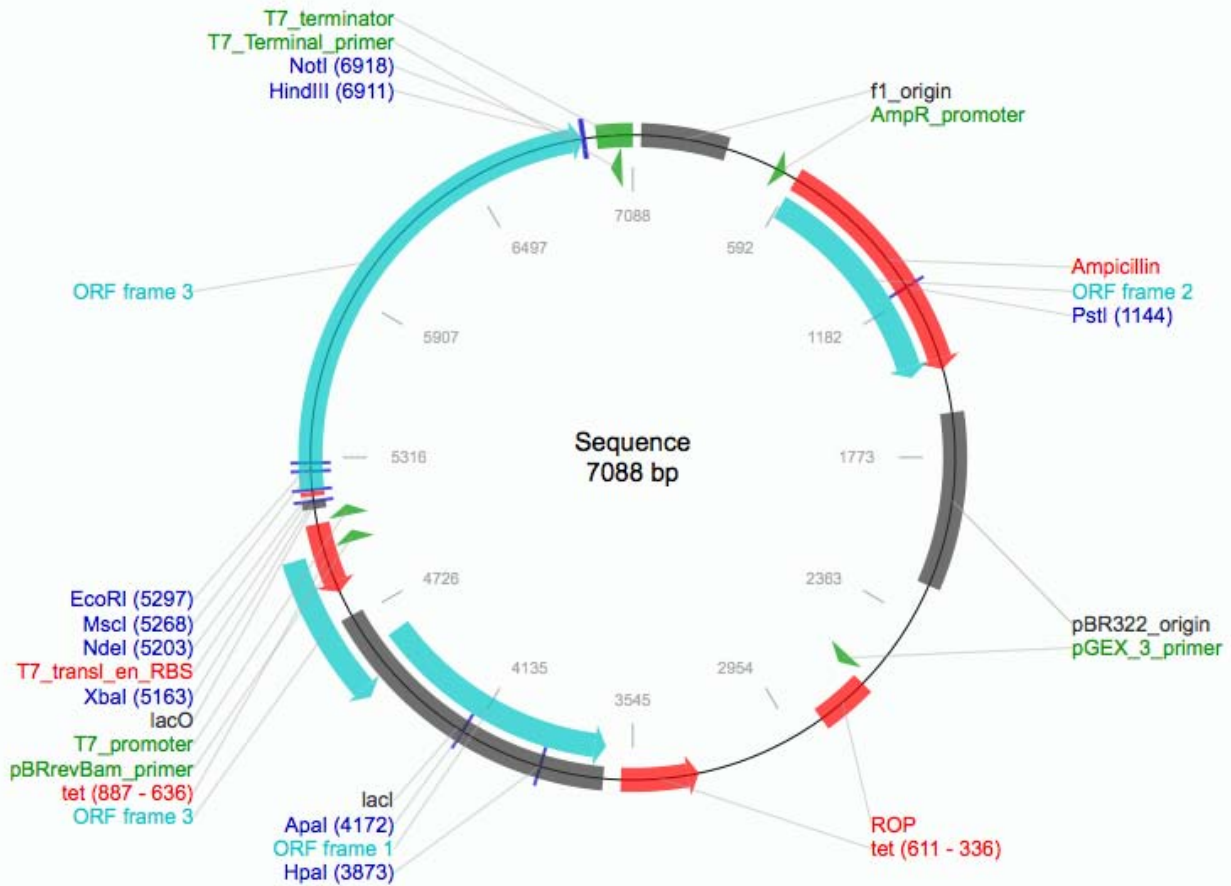


Figura 37. El butil glucósido no es degradado por AmyA. Placa de cromatografía en capa fina revelada con una solución ácida de α -naftol después de eluir 5 muestras. Cada carril corresponde a una muestra. Carril 1: solución de butil glucósido almacenada a 4 °C por 24 horas; carril 2: solución de butil glucósido calentada a 85 °C por 24 horas; carril 3: solución de butil glucósido calentada a 85 °C por 24 horas en presencia de AmyA; carril 4: solución de butil glucósido con 10% butanol calentada a 85 °C por 24 horas en presencia de AmyA; carril 5: mezcla de maltodextrinas (maltooligosacáridos), glucosa (G1) y butil glucósido (BG1). Se usó una concentración de 48 mg/mL de butil glucósido en los experimentos. La degradación del butil glucósido con AmyA debe estar asociada a la aparición de glucosa, maltooligosacáridos o butil glicósidos.

15 Anexo III Mapa de construcción pET22/AmyA con péptido líder pelB creado por Damián Almazo, J.Y. (2006)



La imagen fue creada empleando el servidor addgene para la construcción creada por Damián Almazo, J.Y., 2006. El gen de AmyA está en marco de lectura abierta 3 (ORF frame 3). A continuación se anexa la secuencia de este segmento, creado con el program Serial Cloner V1.3:

EcoRI-AmyA

pel B

TCG GAT CCG AAT

```

A CAT ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GAT ATC GGA ATT AAT TCG GAT CCG AAT
H M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M A M D I G I N S D P N
T GTA TAC TTT ATG GAC GAC GGC TGG CGA CGA CGA CCA GAC GAC LAG GAG CGA CCG GTC GGC GCG TAC CCG TAC CTA TAG CCT TAA TTA AGC CTA GGC TTA
      5210      5220      5230      5240      5250      5260      5270      5280      5290
TCC TGC TTT CAA ACG
TC TGC TTT CAA ACG TCT ATG AGT CAA TCC CTC GTT TCA AGT AAT CCA CAT TCA AAC AGC ACA AAC ACA GAT GGT ACT AGC TCC AAC CTT GAA GAA GTA A
S C F Q T S M S Q S L V S S N P H S N S T N T D G T S S N L E E V K
AG ACG AAA GTT TGC AGA TAC TCA GTT AGG GAG CAA AGT TCA TTA GGT GTA AGT TTG TCG TGT TTG TGT CTA CCA TGA TCG AGG TTG GAA CTT CTT CAT T
      5310      5320      5330      5340      5350      5360      5370      5380      5390

AA TAC CCC GTC GTC TAC GAA ATT TTC ATT CGC TCT TTT TAC GAC AGA GAC GGG AAC GGA GTG GGA GAT TTA AAC GGT GTT TCT CAG AAA GTT GAT TAT CT
Y P V V Y E I P I R S F Y D R D G N G V G D L N G V S Q K V D Y L
TT ATG GGG CAG CAG ATG CTT TAA AAG TAA CCG AGA AAA ATG CTG TCT CTG CCC TTG CCT CAC CCT CTA AAT TTG CCA CAA AGA GTC TTT CAA CTA ATA GA
      5410      5420      5430      5440      5450      5460      5470      5480      5490

G AAG GAA CTC GGC GTT GAC CCT GTG TGG TTT ATG CCC TTC AAC GAG GCT GTT TCA TAC CAT GGA TAC GAC ATA ACA GAC TAC TAC AAC GTC GAG AAA GAC
K E L G V D A V W F M P F N E A V S Y H G Y D I T D Y Y N V E K D
C TTC CTT GAG CCG CAA CTG CGA CAC ACC AAA TAC GGG AAG TTG CTC CGA CAA AGT ATG GTA CCT ATG CTG TAT TGT CTG ATG TTG CAG CTC TTT CTG
      5510      5520      5530      5540      5550      5560      5570      5580      5590

TAC GGC ACC ATG GAA GAT CTC GAA AAC ATG ATC CAG GTG CTC CAT GAG AAC GGA ATA AAG GTA ATA ATG GAT CTC GTG ATC AAC CAC ACA TCC GAT GAG C
Y G T M E D L E N M I Q V L H E N G I K V I M D L V I N H T S D E H
ATG CCG TGG TAC CTT CTA GAG CTT TTG TAC TAG GTC CAC GAG GTA CTC TTG CCT TAT TTC CAT TAT TAC CTA GAG CAC TAG TTG GTG TGT AGG CTA CTC G
      5610      5620      5630      5640      5650      5660      5670      5680      5690
  
```

Sitio de corte EcoRI

AT CCC TGG TTC AAA GAC GCC GTG GAA AAC ACG ACC AGC TCT CCG TAC TGG GAC TAC TAC ATA ATG AGT CTT GAA GAT CAT TCT GGT CAG GAT CAC TGG CA
P W F K D A V E N T T S S P Y W D Y Y I M S L E D H S G Q D H W H
TA GGG ACC AAG TTT CTG CCG CAC CTT TTG TGC TGG TCG AGA GGC ATG ACC CTG ATG ATG TAT TAC TCA GAA CTT CTA GTA AGA CCA GTC CTA GTG ACC GT
5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790

C TGG AAG ATC AAC TCA AAG GGT CAA AAA GTC TGG TAT TTC GGA CTT TTT GGC TAT AAC ATG CCG GAT CTG AAC CAC GAC AGT CAG AAA GTG AGA GAA GAA
W K I N S K G Q K V W Y F G L F G Y N M P D L N H D S Q K V R E E
G ACC TTC TAG TTG AGT TTC CCA GTT TTT CAG ACC ATA AAG CCT GAA AAA CCG ATA TTG TAC GGC CTA GAC TTG GTG CTG TCA GTC TTT CAC TCT CTT CTT
5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890

GTA AAG AAA ATC GTG GAT TTC TGG ATT TCC AAA GGT GTT GAT GGA TTC AGA ATA GAT GCT GCA AAG CAC ATA TAT GGC TGG TCC TGG GAC GAT GGG ATA C
V K K I V D F W I S K G V D G F R I D A A K H I Y G W S W D D G I Q
CAT TTC TTT TAG CAC CTA AAG ACC TAA AGG TTT CCA CAA CTA CCT AAG TCT TAT CTA CGA CGT TTC GTG TAT ATA CCG ACC AGG ACC CTG CTA CCC TAT G
5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990

AG GAG TCG GCC GAA TAT TTT GAA TGG TTC GAT TAT GTG CTT TCC AAA AAG CCC GAT GCC ATA CTT GTG GGA GAG GTG TTC AGC GGA AAC ACG TAC GA
E S A E Y F E W F R D Y V L S K K P D A I L V G E V F S G N T Y D
TC CTC AGC CCG CTT ATA AAA CTT ACC AAG TCT CTA ATA CAC GAA AGG TTT TTC GGG CTA CCG TAT GAA CAC CCT CTC CAC AAG TCG CCT TTG TGC ATG CT
6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090

T CTT TCT CTA TAT CCA ATT CCC GTT TTC AAT TTC GCC CTC ATG TAC AGT ATA AGG AAC TAC CCA GAA GGG CAG GAT GGA ATG ATA GAA AAC AAC TGG GTT
L S L Y P I P V F N F A L M Y S I R N Y G P E G Q D G M I E N N W V
A GAA AGA GAT ATA GGT TAA GGG CAA AAG TTA AAG CCG GAG TAC ATG TCA TAT TCC TTT CCG GGT CTT CCC GTC CTA CCT TAC TAT TTT TTG TTG ACC CAA
6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190

GAG GAG TCT TTC CTG TTT CTT GAG AAT CAC GAT CTC CAC AGG TTC TTC TCC CAT CTT CAA GAA CAT TAC AAA AAG TTC TCC GAG TCC GAC TAC GAG TTC A
E E S F L F L E N H D L H R F F S H L Q E H Y K K F S E S D Y E F I
CTC CTC AGA AAG GAC AAA GAA CTC TTA GTG CTA GAG GTG TCC AAG AAG AGG GTA GAA GTT CTT CTA ATG TTT TTC AAG AGG CTC AGG CTG ATG CTC AAG T
6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290

TC AAA AAA CGT GCT GCT CTC TGG TAT TTT CTG ATA TTC ACA CTG AAA GGA TCT CCT GTT ATC TAC TAC GGC GGT GAA ATT GGA ACG AGA GGT TTC AAG TG
K K R A A L W Y F L I F T L K G S P V I Y Y G G E I G T R G F K W
AG TTT TTT GCA CGA CGA GAG ACC ATA AAA GAC TAT AAG TGT GAC TTT CCT AGA GGA CAA TAG ATG ATG CCG CCA CTT TAA CCT TGC TCT CCA AAG TTC AC
6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390

G CAC GGT CCT GTA TAT GAC GAG CCG GTG AGA GAG CCG ATG CAG TGG TAC GCA AGC GGT ACA GGA GAA GGT CAA ACC TTC TGG ACA AAG GAA GTC TAC AAA
H G P V Y D E P V R E P M Q W Y A S G T G E G Q T F W T K E V Y K
C GTG CCA GGA CAT ATA CTG CTC GGC CAC TCT CTC GGC TAC GTC ACC ATG CGT TCG CCA TGT CCT CTT CCA GTT TGG AAG ACC TGT TTC CTT CAG ATG TTT
6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490

AAC GCG GGG ATA ACC TTT GGA AAC GCT GAT GTT GAC GGA TGT ATC TAT GAC GAT CCT TAC GAT GGC TTT TCT GTC GAA GAA CAG GAA AGC GAT CCG AAG A
N A G I T F G N A D V D G C I Y D D P Y D G F S V E E Q E S D P K S
TTG CGC CCC TAT TGG AAA CCT TTG CGA CTA CAA CTG CCT ACA TAG ATA CTG CTA GGA ATG CTA CCG AAA AGA CAG CTT CTT GTC CTT TCG CTA GGC TTC T
6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590

GT CTT TTG AAT TTC ATC AGA TTC ATT CTC AAC TTC AGA AAA GAT CAC GAC GCC ATT TTG AAT GGA GAT CAA ACG ATC TTC AGG GAC TGG AAA AAC CTC AT
L L N F I R F I L N F R K D H D A I L N G D Q T I F R D W K N L I
CA GAA AAC TTA AAG TAG TCT AAG TAA GAG TTG AAG TCT TTT CTA GTG CTG CCG TAA AAC TTA CCT CTA GTT TGC TAG AAG TCC CTT CAG ACC TTT TTG GAG TA
6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690

A GCG TTC TAC AGA GAA TCC TCC AAC GAA AAG CTG TTG GTG GTC TTG AAT CCG GAT CCA GTC TGG CAA AAC AGC TTC ACT TTT GAA GAA AAC ATG ACG ATG
A F Y R E S S N E K L L V V L N P D P V W Q N S F T F E E N M T H
T CGC AAG ATG TCT CTT AGG AGG TTG CTT TTC GAC AAC CAC CAG AAC TTA GGC CTA GGT CAG ACC GTT TTG TCG AAG TGA AAA CTT CTT TTG TAC TGC TAC
6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790

ATT CTC GAG GTA GAT TTT GAA AAC TTC ATC TGG AAC GAG TCA AAC GTG TCT TTT TCA GCG GGT GAA TCC TTC ACT GTG GAT CCC ATG AAA GCG TAC ATT T
I L E V D F E N F I W N E S N V S F S A G E S F T V D P M K A Y I F
TAA GAG CTC CAT CTA AAA CTT TTG AAG TAG ACC TTG CTC AGT TTG CAC AGA AAA AGT CCG CCA CTT AGG AAG TGA CAC CTA GGG TAC TTT CGC ATG TAA A
6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890

Sitio de corte HindIII

TC AAA AAG TGA AGC TTG GAT CCG CCG CAC TCG AGC ACC ACC ACC ACC ACC ACT GAG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CT
K K * S L D R P H S S T T T T T E I R L L T K P E R K L S W L L
AG TTT TTC ACT TCG AAC CTA GCC GGC GTG AGC TCG TGG TGG TGG TGA CTC TAG GCC GAC GAT TGT TTC GGG CTT TCC GAC TCA ACC GAC GA
6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990

AG TTT TTC ACT TCG AAC CTA

AmyA2

CGC ATG TAA