



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE  
UNA AMILASA DE LA LAPA MARINA**

*(Megathura crenulata)*

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JOSÉ IGNACIO DÁVILA SOTO**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.

## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MONTIEL AGUIRRE JESUS FERNANDO

VOCAL: Profesor: LOPEZ MUNGUIA CANALES AGUSTIN

SECRETARIO: Profesor: HERNANDEZ SANTOYO ALEJANDRA

1er. SUPLENTE: Profesor: NAVARRO OCAÑA ARTURO

2° SUPLENTE: Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSE

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## ASESOR DEL TEMA:

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

## SUSTENTANTE

JOSÉ IGNACIO DÁVILA SOTO

## **AGRADECIMIENTOS**

De la manera más sincera quiero agradecer y dar el mérito de este logro a mi familia, ya que gracias al apoyo y confianza que han tenido en mí, he logrado alcanzar uno de mis objetivos, el cual es una parte fundamental para poder cristalizar los que vienen en camino. Mi familia es el motor que me alenta a seguir adelante y luchar por ser mejor, tanto en el ámbito personal como laboral.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de estudiar y facilitarme una formación profesional, darme la oportunidad de retribuir con la sociedad, buscando que México sea un país mejor y llevar con orgullo el hecho de ser Universitario.

A mis amigos, los cuales han sido una parte fundamental para mi formación personal.

A la QFB María del Rocío Patiño Maya por su invaluable apoyo técnico

Al programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo al proyecto IN207013

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto 1664

## RESUMEN

Después de la celulosa y la hemicelulosa, el almidón es uno de los polisacáridos de reserva más abundante en el planeta, sin olvidar otros polisacáridos también importantes como la quitina, pectina y la inulina. Está formado por dos tipos de polisacáridos: la amilosa y la amilopectina, los cuales constan únicamente de monómeros de D-glucopiranosos unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6. Para que la hidrólisis enzimática del almidón sea más eficiente se requieren al menos tres tipos de amilasas: La  **$\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1)** la cual, realiza una endohidrólisis al azar en el enlace  $\alpha$ -1,4 de la amilosa y la amilopectina. Los productos de la hidrólisis de la amilosa son la maltosa, maltotriosa y oligosacáridos superiores, mientras que la hidrólisis de la amilopectina genera maltosa, glucosa y dextrinas límite. La  **$\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2)** es una exoenzima que rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 en el extremo no reductor para producir el disacárido  $\beta$ -maltosa, siempre y cuando, la cadena contenga un número par de unidades de glucosa y en el caso de tener un número impar, se libera glucosa. La  **$\gamma$ -amilasa (EC 3.2.1.3)**, también llamada glucoamilasa, rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 de la amilosa y la amilopectina, algunos glucanos y el enlace  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina para producir glucosa, maltosa, maltotriosa y oligomaltosa. En el presente estudio se purificó y caracterizó a una amilasa del molusco marino *Megathura crenulata*. La enzima se purificó por cromatografía de afinidad utilizando agar como matriz de unión, seguida de una exclusión molecular. Por espectrometría de masas se determinó que tiene una masa de 6.4 kDa. Esta enzima mostró indicios de ser una  **$\alpha$ -amilasa**, mostró una fuerte tendencia a oligomerizar, este comportamiento puede estar favorecido por la presencia de 5.4 % de glicosilación en su estructura. La actividad de la amilasa mostró un óptimo a pH 6 y 35 °C. Fue inhibida por completo en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  mientras que el  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan su actividad. La amilasa mostró termoestabilidad media, su  $T_m$  fue de 70 °C, su estabilidad se incrementa en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 y en presencia de acetato de praseodimio, calcio, galactosa, espermidina y glutatión reducido. Los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano demostraron que se trata de una proteína intrínsecamente desestructurada y que en presencia de galactosa adquiere estructura donde predominan las hélices. Tiene actividad de lectina y su especificidad es por galactósidos.

# CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>2.0. GENERALIDADES</b> .....	<b>10</b>
2.1. POLISACÁRIDOS .....	10
2.1.1 Almidón .....	10
2.1.2 Amilosa.....	11
2.1.3 Amilopectina.....	12
2.2. ENZIMAS QUE HIDROLIZAN POLISACÁRIDOS .....	13
2.3. AMILASAS.....	14
2.3.1. $\alpha$ -amilasa (3.2.1.1).....	14
2.3.2. $\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2) .....	16
2.3.3. $\gamma$ -amilasa (EC 3.2.1.3).....	17
2.3.4. Otras amilasas.....	18
2.3.5. Cocteles enzimáticos .....	23
2.4. APLICACIÓN DE AMILASAS.....	24
2.5 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE HIDRÓLISIS DE LAS AMILASAS .....	24
2.6 MEGATHURA CREMULATA .....	30
<b>3.0 HIPOTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.0 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	33
<b>5.0 MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 TRATAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	34
5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA.....	34
5.2.1. Preparación del reactivo DNS.....	35
5.2.2 Curva patrón de maltosa.....	35
5.2.3 Tratamiento de la muestra .....	36
5.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA .....	36
5.4 PURIFICACIÓN DE UNA AMILASA DE <i>M. CREMULATA</i> .....	37
5.4.1 Cromatografía de afinidad.....	37
5.4.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	38
5.5 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y PUREZA DE LA PROTEÍNA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF .....	38

5.6 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE ACTIVIDAD.....	39
5.6.1 <i>Temperatura óptima</i> .....	39
5.6.2 <i>pH óptimo</i> .....	39
5.7 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD.....	39
5.7.1 <i>Procesamiento de las muestras</i> .....	41
5.8 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	41
5.9. EFECTO DE ADITIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD.....	42
5.10 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA AMILASA DE <i>M. CREMULATA</i> .....	42
5.10.1 <i>Efecto de la temperatura en la estabilidad funcional de la amilasa de M. crenulata</i> ....	42
5.10.2 <i>Evaluación de la estabilidad de la amilasa por fluorometría diferencial de barrido</i> ....	43
5.11 ESTUDIO CONFORMACIONAL Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA AMILASA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR.....	46
5.12 PRUEBAS DE ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.....	48
5.13 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD.....	49
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
6.1 PURIFICACIÓN.....	49
6.2 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y PUREZA DE LA PROTEÍNA.....	52
6.3 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES.....	54
6.4 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE TEMPERATURA Y PH PARA LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA DE <i>M. CREMULATA</i> .....	55
6.5 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD.....	55
6.6. EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS EN LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA DE <i>M. CREMULATA</i> .....	56
6.7 ESTABILIDAD DE LA AMILASA DE <i>M. CREMULATA</i> .....	58
6.7.1 <i>Efecto del pH y sales amortiguadoras</i> .....	59
6.7.2. <i>Efecto de diferentes iones en la estabilidad de M. crenulata</i> .....	61
6.7.3. <i>Efecto de diferentes agentes solubilizantes en la estabilidad de la amilasa pura</i> .....	62
6.8 ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR EN EL UV LEJANO.....	64
6.9 ACTIVIDAD DE LECTINA.....	65
<b>7.0 CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>8.0 REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>

## ABREVIATURAS

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero de bovino

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Da: Daltones

DC: Dicroísmo circular

DHB: Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DSF: Fluorimetría Diferencial de Barrido (Por sus siglas en inglés, Differential scanning fluorimetry)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ECF: Eritrocitos de conejo formalinizados

kDa: kilo daltones

MALDI-TOF: Espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistidas por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo

nm: Nanómetros

PEG: Polietilenglicol

PID: Proteínas intrínsecamente desordenadas

rpm: Revoluciones por minuto

RT PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Por sus siglas en inglés, Real Time Polymerase Chain Reaction)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de docedil sulfato de sodio

Súper DHB: mezcla de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con ácido 2-hidroxi-5 metoxibenzoico en una relación 9:1

U: Unidad de actividad

UV: Ultravioleta

## 1.0 INTRODUCCIÓN

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes en el planeta después de la celulosa y la hemicelulosa, los cuales se producen en las hojas de las plantas verdes, semillas, frutas, tallos, raíces y tubérculos. El almidón se compone de dos tipos de polisacáridos: amilosa y amilopectina, compuestos exclusivamente de residuos de D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1,4) en el caso de la amilosa y enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\sim$ 5% de ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -(1,6) en la amilopectina, ambos combinados en un gránulo insoluble en agua que es parcialmente cristalino y cuyo tamaño, forma y morfología dependen de su fuente biológica. Las amilasas son las enzimas capaces de hidrolizar este polisacárido para formar productos compuestos por diversas unidades de glucosa.<sup>1, 4, 5</sup>

Las amilasas son enzimas muy importantes en la industria biotecnológica, con aproximadamente el 25% del mercado en la industria alimenticia. La degradación enzimática del almidón por acción de la  $\alpha$ -amilasa a escala industrial, ha sido practicada por muchos años y ha reemplazado considerablemente los procesos tradicionales de catálisis ácida. Se estima que cerca del 75% de los jarabes y dextrosa sólida son producidos mediante procesos enzimáticos, es decir, una nueva tecnología se ha acentuado en el área de la degradación del almidón por la acción de las amilasas, entre las que se encuentran la  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, amiloglucosidasa y pululanasa obtenidas principalmente de bacterias y hongos. Estas enzimas actúan sobre el almidón hidrolizando enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) y/o  $\alpha$ -(1,6).

El espectro de aplicación de las amilasas es muy amplio, como la medicina, química clínica y analítica, en la sacarificación y licuefacción del almidón para la producción de bebidas alcohólicas, producción de jarabes, en la industria textil, en alimentación animal, industria azucarera y en el tratamiento de aguas residuales, entre otras. Es por esto que se continúa con la búsqueda de nuevas fuentes de amilasas como es el caso de los organismos marinos, en los cuales se ha observado que presentan características de actividad y estabilidad muy interesantes para su aplicación industrial. Por lo antes mencionado, en el presente estudio se purificó y caracterizó a una amilasa termorresistente del tracto digestivo del molusco marino *Megathura crenulata*, con el fin de profundizar en el conocimiento de las características bioquímicas y estructurales de la misma.

## **2.0. GENERALIDADES**

### **2.1. Polisacáridos**

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden tener una función de reserva como el almidón, glucógeno, algunos  $\beta$ -D glucanos, fructanos y algunos galactomananos; pueden tener una función estructural, clasificándose en: fibrosos como la celulosa, quitina, 1,3- $\beta$ -D mananos y de matriz, que se caracterizan por su capacidad de formar geles (agar, carragenano, alginato, etc.) o bien, pueden actuar como sustancias de reconocimiento celular (polisacáridos extracelulares antigénicos e inmunogénicos). Estos polímeros (celulosa, quitina, etc) también llamados glicanos, se clasifican por los carbohidratos que los forman, el tipo de enlace que los une, la longitud de sus cadenas y el grado de ramificación. Los homopolisacáridos están constituidos por un solo tipo de monosacárido, mientras que los heteropolisacáridos están constituidos de diferentes tipos de monosacáridos. Pueden estar unidos por enlaces glicosídicos tipo alfa o beta. Los enlaces alfa son más débiles, se rompen y forman con gran facilidad, por lo que se encuentran en los polisacáridos con funciones de alimentos de reserva, como el almidón o el glucógeno. El enlace tipo beta es mucho más estable y resistente, por lo que es característico de polisacáridos con función estructural, como es el caso de la celulosa. A diferencia de las proteínas, los polisacáridos generalmente no tienen pesos moleculares definidos<sup>1, 4, 6</sup>

#### **2.1.1 Almidón**

Este polisacárido de reserva, se deposita en forma de gránulos altamente ordenados de diferentes formas, tamaños y composición, según su origen. El almidón es semicristalino, insoluble en agua y está empacado densamente en un pequeño volumen. A pesar de esta insolubilidad el almidón está accesible para una despolimerización enzimática y puede ser degradado por enzimas metabólicas. Temporalmente se puede almacenar en los cloroplastos de las hojas durante el periodo de luz. Los amiloplastos, tanto en semillas, granos o tubérculos, sirven para almacenar y proveer de glucosa por largos periodos durante la germinación para el crecimiento y desarrollo de semillas y raíz.<sup>1,4</sup> La mayoría de los almidones están compuestos de dos clases de polisacáridos, uno lineal formado por glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) y que se conoce como amilosa y otro formado por glucosas unidas

por enlaces  $\alpha$ -(1,4) con 4.2-5.9% de ramificaciones en  $\alpha$ -(1,6) y que se conoce como amilopectina (Figura 1)<sup>5</sup>.

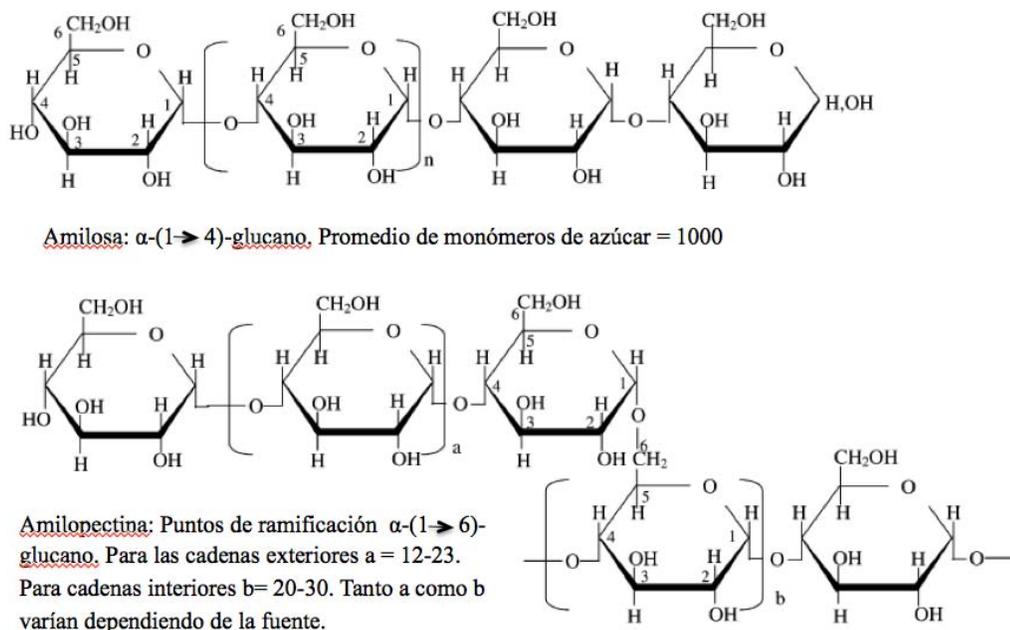


Figura 1. Estructura de los componentes del almidón. En el caso de la amilosa (arriba) está formada por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y en el caso de la amilopectina (abajo), las unidades de D-glucopiranosas están unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 (Tomado de Tester *et al*, 2004)<sup>5</sup>

### 2.1.2. Amilosa

La amilosa es un polisacárido formado por una cadena lineal de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 (20-30%), su grado de polimerización es aproximadamente de 1600 unidades. Actualmente se conoce que tiene un porcentaje bajo de ramificación mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,6 (0.1%). Comúnmente forma una estructura helicoidal de 6 unidades de anhidroglucosa, en donde los grupos hidroxilos son orientados hacia el exterior de la hélice permitiendo interacciones polares y/o puentes de hidrógeno con hélices de amilosa vecinas, lo que es de gran importancia para la estructura del gránulo de almidón. Las moléculas de amilosa tienen una tendencia a orientarse de manera paralela entre ellas mismas mediante puentes de hidrógeno, mientras tanto, en el interior de la hélice hay

condiciones hidrofóbicas, lo que permite la incorporación de ácidos grasos libres, monoglicéridos, fosfolípidos o alcoholes alifáticos, formando complejos de inclusión.<sup>2,3</sup>

### ***2.1.3. Amilopectina***

La amilopectina es el polisacárido que se presenta en mayor proporción en el almidón (70-80%); está formado por cadenas de residuos de  $\alpha$ -D-Glucopiranososa unidos mediante enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4, el grado de polimerización es de 6000 a 8000 unidades. Está compuesto por una estructura molecular altamente ramificada (5-6%) mediante enlace glicosídico  $\alpha$ -1,6. (Figura 2A).<sup>2,3</sup>

Los modelos actuales que describen la arquitectura de la amilopectina están basados en la identificación experimental de tres diferentes cadenas de unidades de D-Glucopiranososa, las cuales se denominan A, B y C. La cadena exterior y más pequeña es la A, alrededor de 6-15 residuos, que no contiene ramificaciones y es unida a través de su extremo no reductor con la cadena B mediante un enlace simple  $\alpha$ -1,6. La cadena B se puede dividir en subcadenas B1 (15-25 residuos), B2 (40-50 residuos) y B3 (> 50 residuos), en donde se unen dos o más cadenas A o B. La cadena sencilla C une cadenas B y es la que contiene el residuo D-Glucósido terminal no reductor. La relación de cadenas A y B varía dependiendo el origen del almidón, las cadenas individuales presentes en la molécula de amilopectina son empacadas en grupos densamente ramificados llamados racimos (Clusters) (Figura 2B).<sup>2,3</sup>

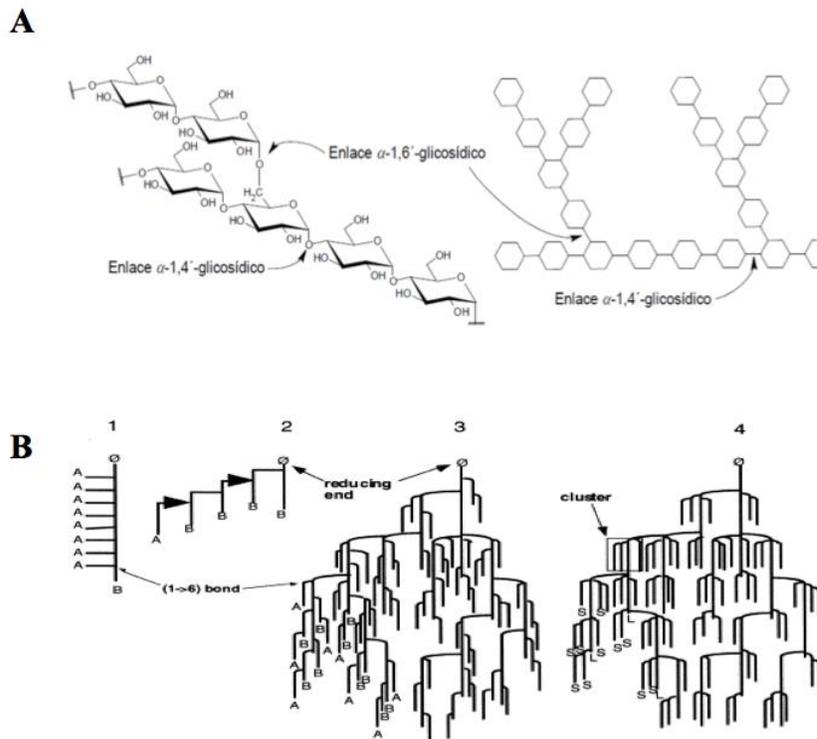


Figura 2. (A) Estructura de la amilopectina en donde se observa las unidades de D-Glucosa enlazadas mediante enlace  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 (B) Representación teórica de la arquitectura adoptada por las ramificaciones presentes en la amilopectina.

## 2.2. Enzimas que hidrolizan polisacáridos

A las enzimas capaces de hidrolizar oligo- y polisacáridos dando como producto azúcares más simples, se les conoce como glicohidrolasas (EC. 3.2.1)<sup>1</sup>, son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en bacterias, hongos, plantas y animales.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Todas las enzimas conocidas tienen un número EC basado en las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), esta clasificación enzimática se basa en dos puntos, en la reacción de catálisis que llevan a cabo y en su sustrato específico.

Las comparaciones de secuencias de aminoácidos de glicosilhidrolasas y transglicosilasas han permitido un esquema de clasificación para estas enzimas, basado en la estructura terciaria, en lugar de su especificidad,<sup>5,6</sup> es decir, estas enzimas han sido agrupadas en más de 80 familias, donde los miembros de una familia comparten una estructura tridimensional común y el mismo mecanismo catalítico, y pueden tener poca o mucha similitud en la secuencia. Las familias 13, 70 y 77 contienen enzimas con estructura y funcionalidad relacionadas, que catalizan la hidrólisis o transglicosilación de enlaces  $\alpha$ -glucanos.<sup>6</sup>

### **2.3. Amilasas**

El término “amilasa” generalmente se define como la enzima capaz de hidrolizar el enlace glicosídico del almidón y del glucógeno (Figura 3, Tabla 1). Las enzimas que catalizan la hidrólisis o la síntesis de enlaces glicosídicos se agrupan en la llamada familia de las  $\alpha$ -amilasas, representada por cuatro tipos de reacciones enzimáticas: (1) Las que hidrolizan el enlace  $\alpha$ -1,4, (2) las que hidrolizan el enlace  $\alpha$ -1,6, (3) las que llevan a cabo una transglicosilación en el enlace  $\alpha$ -1,4 y (4) las que llevan a cabo una transglicosilación en el enlace  $\alpha$ -1,6.<sup>6</sup>

#### **2.3.1. $\alpha$ -amilasa (3.2.1.1)**

A la  $\alpha$ -amilasa también se le conoce como amilasa dextrinogénica. Esta enzima realiza una endohidrólisis al azar en el enlace  $\alpha$ -1,4 de la amilosa y amilopectina. Los productos de hidrólisis de la amilosa son la maltosa, maltotriosa y oligosacáridos superiores mientras que de la amilopectina son la maltosa, glucosa y dextrinas límite.<sup>8</sup>

Las  $\alpha$ -amilasas se pueden dividir en (i) *amilasa maltogénica* (1,4- $\alpha$ -D-glucan  $\alpha$ -maltohidrolasa) (EC 3.2.1.133) que produce maltosa mediante la ruptura del enlaces  $\alpha$ -1,4 del extremo no reductor de las moléculas de amilosa, (ii) *maltohidrolasa* (1,4- $\alpha$ -D-glucanmaltohidrolasa) (EC 3.2.1.116) que rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 del extremo no reductor de la maltotriosa, (iii) *maltotetrahidrolasa* (1,4- $\alpha$ -maltotetrahidrolasa) (EC 3.2.1.60) que hidroliza igual que la maltohidrolasa, pero produciendo maltotetraosa y (iv) *maltohexahidrolasa* (1,4- $\alpha$ -D-glucanmaltohexahidrolasa) cuyo producto de hidrólisis es la maltohexaosa.<sup>9,10</sup>

La aplicación de estas amilasas depende del porcentaje de hidrólisis del almidón al cual se quiera llegar, siendo para el caso de la licuefacción un porcentaje de 30-40% y para la sacarificación entre un 50-60% de hidrólisis.<sup>11</sup> Es necesaria una buena licuefacción para poder tener una sacarificación, y en caso que sea necesario, una posterior isomerización. En general, la mayoría de las amilasas tienen una mejor hidrólisis en un intervalo de pH entre 6.0-7.0 y toleran mejor las condiciones alcalinas, pueden perder la actividad amilolítica con el paso del tiempo y con un incremento en la temperatura, también se pueden inhibir con el aumento en la concentración de pequeños sacáridos como glucosa y maltosa.<sup>12</sup> Dependiendo el origen de la enzima es la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que requieren para la hidrólisis. Estos factores bioquímicos de estabilidad y actividad son muy variables entre especies.

### **2.3.1.1. $\alpha$ -amilasas de diferentes fuentes**

- *Humanos y animales:* En los humanos, son aisladas de la saliva (Ptialina), páncreas (Pancreatina), hígado y músculo.<sup>13</sup> En los animales no están muy estudiadas este tipo de enzimas, y mucho menos en organismos de origen marino, con base en estudios preliminares se ha observado que las amilasas producidas por este tipo de organismos son de gran interés biotecnológico, por ejemplo, se ha estudiado el conjunto de enzimas producidas por el sistema digestivo de algunos gasteropodos, principalmente en *Megathura crenulata* (organismo estudiado en este trabajo), otro ejemplo es la  $\alpha$ -amilasa aislada del kril (*Euphausia superba*), la cual es una mezcla de 4 tipos de isoformas, con un peso molecular de 17 kDa, una de las pequeñas reportadas a la fecha, su óptimo de temperatura y pH son 35 °C y 6.4 respectivamente, dicha actividad se ve aumentada en presencia de iones  $\text{Co}^{2+}$ , L-cisteína, glutatión y ácido tioglicólico.<sup>14</sup>
- *Plantas:* Se pueden extraer de semillas, frutos, hojas, tallos y raíces.<sup>15</sup> Soya, cebada y haba verde son comúnmente utilizadas para su extracción. La actividad hidrolítica de las amilasas de plantas depende del tiempo de maduración, entre mayor grado de germinación tenga la planta, tendrá mayor capacidad de hidrolizar el almidón.<sup>16</sup> Algunas plantas (principalmente cebada) pueden secretar enzimas termoestables, las cuales tienen óptimos de actividad a 60°C, cebada es un buen productor de  $\alpha$ -amilasas.<sup>17,19</sup>

- *Bacterias*: Algunas bacterias aerobias meso- y termófilicas, formadoras y no formadoras de spora, pueden producir enzimas capaces de degradar el almidón. Algunas amilasas bacterianas pueden mantener su actividad incluso por arriba de 95°C a valores cercanos de pH 7<sup>19,20</sup> y por encima de 105°C por 2 horas.<sup>21</sup> A continuación se mencionan algunos ejemplos de  $\alpha$ -amilasas producidas por bacterias, las cuales presentan características interesantes: *Bacillus licheniformis* es sin duda junto a *Bacillus stearothermophilus* unas de las más utilizadas industrialmente ya que producen una  $\alpha$ -amilasa que tiene un intervalo de hidrólisis y de pH de 95-110 y 5-7 respectivamente y requieren una concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de 5 ppm,<sup>22</sup> *B. coagulans* produce una  $\alpha$ -amilasa termoestable que realiza la hidrólisis óptima a 91°C y pH de 9.5, esta enzima retiene más del 50% de la actividad original a una temperatura de 110°C<sup>23</sup> y se ve inactivada por altas concentraciones de glucosa.<sup>24</sup> Otra  $\alpha$ -amilasa termoestable aislada de *Bacillus subtilis*, la cual es una combinación de dos isoformas que tienen un intervalo de hidrólisis de temperatura y pH entre 80-85°C y 6-7 respectivamente y requiere una concentración mínima de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de 150 ppm<sup>25</sup> *Streptococcus bovis* puede romper enlaces  $\alpha$ -1,6.<sup>26</sup> *Thermococcus profundus* produce una  $\alpha$ -amilasa que puede hidrolizar el enlace  $\alpha$ -1,4 del almidón y el enlace  $\alpha$ -1,6 de pululano (polisacárido formado por unidades de maltotriosa, también conocido como  $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -1,6-glucano, su óptimo de actividad es a un pH de 5.5 y entre 80 y 90°C.<sup>27</sup>
- Hongos: 18 géneros de hongos muestran actividad amilolítica<sup>28</sup>, pero sólo algunos géneros como son: *Syncephalastrum*, *Catenularia*, *Aspergillus*, y *Thamnidium* presentan alta actividad de  $\alpha$ -amilasa.<sup>29</sup> La  $\alpha$ -amilasa producida por *Aspergillus oryzae* tiene un intervalo de temperatura y de pH de 55-70 °C y 4-5 respectivamente y requiere una concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de 50 ppm.<sup>30</sup>

### 2.3.2. $\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2)

Exoenzima que produce el disacárido  $\beta$ -maltosa, rompiendo el enlace  $\alpha$ -1,4 en el extremo no reductor, siempre y cuando la cadena del polisacárido contenga un número par de unidades de glucosa, en el caso de tener un número impar, se libera glucosa.<sup>31,32</sup> Con frecuencia, la sacarificación del almidón con  $\beta$ -amilasa constituye el segundo paso en la producción de maltosa, y está precedida por la licuefacción de almidón con  $\alpha$ -amilasa.<sup>33</sup>

### 2.2.2.1. $\beta$ -amilasas de diferentes fuentes

- Humanos y animales: En animales se ha encontrado dentro del intestino medio de algunas larvas e insectos, llevando a cabo la hidrólisis de la amilosa y amilopectina.<sup>34</sup>
- Plantas: Soya, cebada, arroz, trigo, papa y haba verde son fuentes comunes de  $\beta$ -amilasa. Son encontradas principalmente en las semillas de plantas superiores, y se mantiene en una forma inactiva hasta la germinación y/o maduración.<sup>35</sup>
- Bacterias: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa* y *Bacillus circulans* son fuentes comunes de  $\beta$ -amilasas bacterianas, las cuales pueden ser genéticamente modificadas para aumentar su termoestabilidad.<sup>36</sup>
- Hongos: *Aspergillus oryzae* es una buena fuente de  $\beta$ -amilasa, también se encuentran en *A. awamori* y *Syncephalastrum racemosum*.<sup>37</sup>

### 2.3.3. $\gamma$ -amilasa (EC 3.2.1.3)

También llamada glucoamilasa rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 de la amilosa, amilopectina, algunos glucanos y el enlace  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina.<sup>38,39</sup> En general, el óptimo de temperatura está entre los 40-60°C, (más alto que el de las  $\alpha$ -amilasas), el óptimo de pH es entre 5.0-6.5.<sup>40</sup> Frecuentemente, los organismos que secretan esta enzima lo hacen en compañía de la  $\alpha$ -amilasa. La secreción de una sola forma de glucoamilasa es muy poco común. Se pueden clasificar en glucoamilasas que pueden convertir el almidón y dextrinas- $\beta$ -límites completamente en glucosa y las que no pueden.

#### 2.3.3.1. $\gamma$ -amilasas de diferente fuente

- Bacterias: Se han aislado de *Bacillus firmus* y *Bacillus stearothermophilus*, algunas especies de *Clostridium* y *Flavobacterium*, *Halobacter sodamense*, *Lactobacillus brevis* y *Monascus kaoliang*.<sup>41, 42, 43</sup>
- Hongos: Sin duda, la glucoamilasa más comúnmente utilizada es la producida por *Aspergillus niger*, de la cual, se han aislado dos isoformas, una de ellas es muy dependiente de pH, fuerza iónica y temperatura, la cual tiene un intervalo de actividad

de 55-65 °C y pH de 3.5-5, mientras que la otra es débilmente dependiente del pH y fuerza iónica.<sup>44</sup>

#### **2.3.4. Otras amilasas**

##### **2.3.4.1. $\alpha$ -Glucosidasa (EC 3.2.1.20)**

Exoenzima que actúa de manera similar a la glucoamilasa, pero con la diferencia que únicamente hidroliza sobre disacáridos, oligosacáridos y aril-glucósidos, produciendo glucosa. Puede estar presente en animales, plantas, bacterias y hongos. Todas las plantas tienen  $\alpha$ -Glucosidasa como una enzima endocelular, también está presente en cereales germinados y no germinados.<sup>45</sup>

##### **2.3.4.2. Pululanasa (EC 3.2.1.41)**

La pululanasa tipo 1 rompe el enlace  $\alpha$ -1,6 de amilopectina, dextrinas y pululano, y la pululanasa tipo 2, la cual es menos específica que la de tipo 1, hidroliza el enlace  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 en almidón y dextrinas. Se puede encontrar en plantas, bacterias y menos común en hongos.<sup>46</sup>

La pululanasa más utilizada industrialmente para la degradación enzimática del almidón es la obtenida a partir de *Bacillus acidopolluticus*, la cual tiene un intervalo de actividad de 55-65 °C y pH de 3.5-5.<sup>47</sup>

##### **2.3.4.3. Neopululanasa (EC 3.2.1.135)**

Enzima recientemente descrita, la cual, cataliza la hidrólisis y la transglucosilación de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de pululano, vinculada a un solo centro activo. Los resultados de una serie de experimentos utilizando neopululanasa indicaron que las cuatro reacciones mencionadas anteriormente podrían llevarse a cabo por una misma enzima.<sup>48</sup>

##### **2.3.4.4. Isoamilasa (EC 3.2.1.68)**

Esta enzima hidroliza el enlace  $\alpha$ -1,6 de amilopectina y dextrinas, formando los respectivos oligosacáridos dependiendo del tamaño de la cadena lateral. Inicialmente fue identificada como una amilosintetasa. La unión  $\alpha$ -1,6 es indispensable para esta acción hidrolítica.<sup>49</sup>

#### **2.3.4.5. Glucosiltransferasa (EC 2.4.1)**

Las ciclodextrinas son oligómeros de unidades de D-glucosa cíclicos, conformados por 6 o más unidades mediante un enlace  $\alpha$ -1,4, los anillos de 6,7 y 8 unidades reciben el nombre de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas. Estas ciclodextrinas son formadas por la acción de las ciclodextringlucosiltransferasas (CGTasas) sobre almidón, amilosa y otros polisacáridos. La importancia de estos compuestos, es debido a que son capaces de formar complejos de inclusión con diversas moléculas onárgicas e inorgánicas.<sup>50</sup>

#### ***Clasificación general de las amilasas***

En 1991, Bernard Henrissat clasificó a las glicosido hidrolasas, responsables de hidrolizar enlaces glicosídicos con base en la similitud de sus secuencias proteicas agrupándolas en familias. Cada familia refleja las características estructurales y la relación evolutiva del conjunto de enzimas que agrupa. A su vez, las familias se asocian en grupos denominados clanes. Cada clan intenta agrupar a las familias de enzimas que poseen un origen común, que presentan similitudes significativas en su estructura terciaria y que conservan residuos y mecanismos catalíticos.<sup>51-56</sup>

Según Henrissat, las enzimas amilolíticas se agrupan en tres familias: familias 13, 14 y 15 (Tabla 1, Figuras 4 y 5). La familia 13, que se engloba en el clan GH-H, incluye la mayoría de enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, pululanasas, isoamilasas y ciclodextringlucosiltransferasas). La familia 14 contiene a las  $\beta$ -amilasas y no se engloba en ningún clan. Finalmente, la familia 15, que pertenece al clan GH-L, incluye a las glucoamilasas.

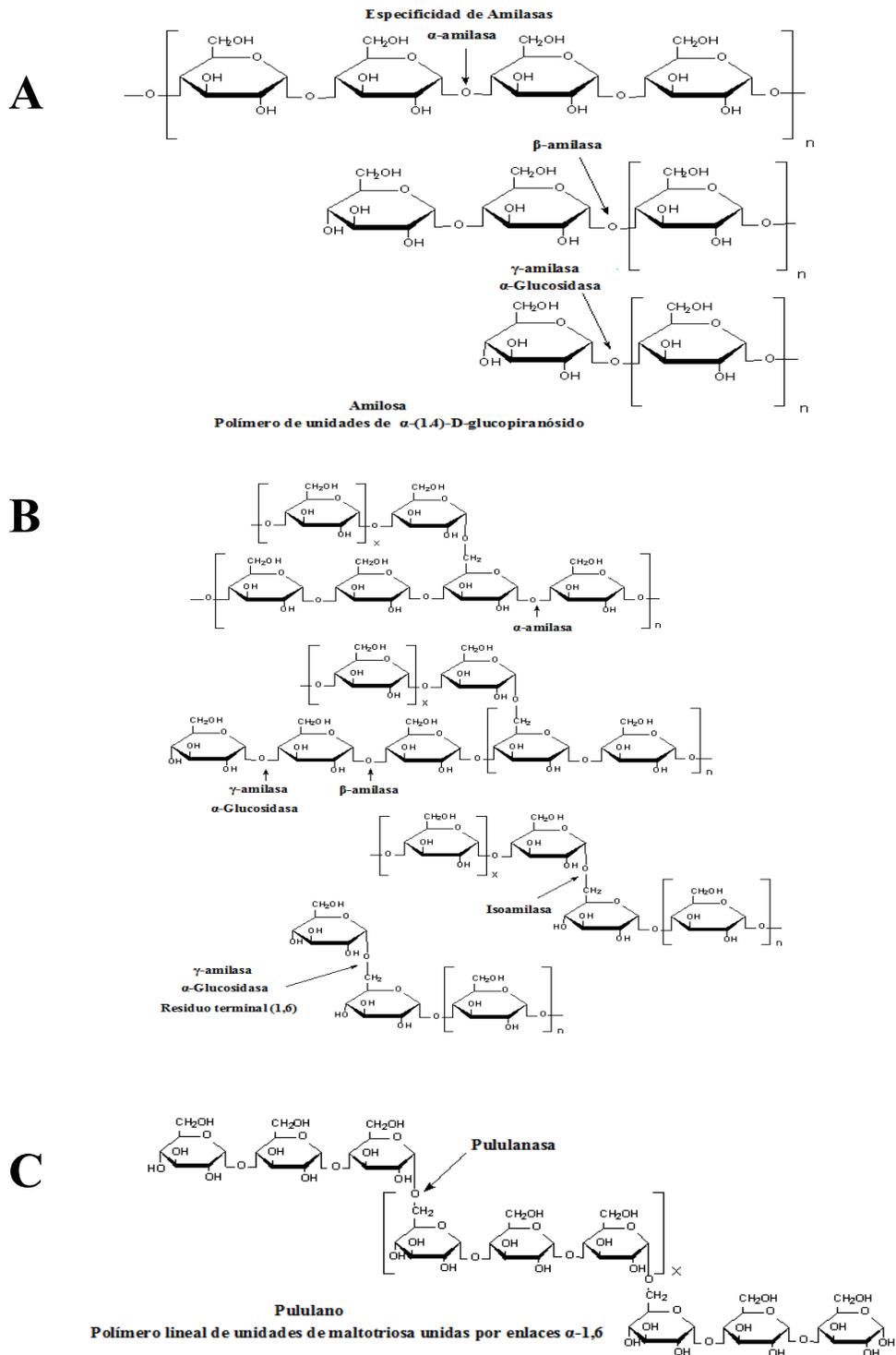


Figura 3. Representación esquemática de la actividad catalítica de las principales amilasas sobre sus diferentes sustratos. (A) Amilosa (B) Amilopectina y Glucógeno y (C) Pululano.

Tabla 1. Esquema de las principales enzimas amilolíticas clasificadas funcionalmente según Henrissat (1991). Se señala la actividad catalítica que poseen y los productos que generan.

<b>Familia (Clan)</b>	<b>Enzima</b>	<b>Actividad</b>	<b>Productos de hidrólisis</b>
13 (GH-H)	$\alpha$ -Amilasa	Endoamilasa. Degrada, aleatoriamente, enlaces $\alpha$ -1,4 en el interior de las moléculas de almidón.	Oligosacáridos de longitud variable.
	$\alpha$ -Glucosidasa	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Residuos de glucosa, con configuración $\alpha$ .
	Pululanasa	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón, pululano y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
	Isoamilasa	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón y glucógeno	Oligosacáridos de longitud variable.
	Ciclodextrin glicosiltransferasa	Transferasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 en las moléculas de almidón. Posee la capacidad de formar nuevos enlaces glicosídicos.	Ciclodextrinas.
14	$\beta$ -Amilasa	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Disacáridos de glucosa (maltosa).
15 (GH-L)	Glucoamilasa	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón	Residuos de glucosa, con $\beta$ -configuración.

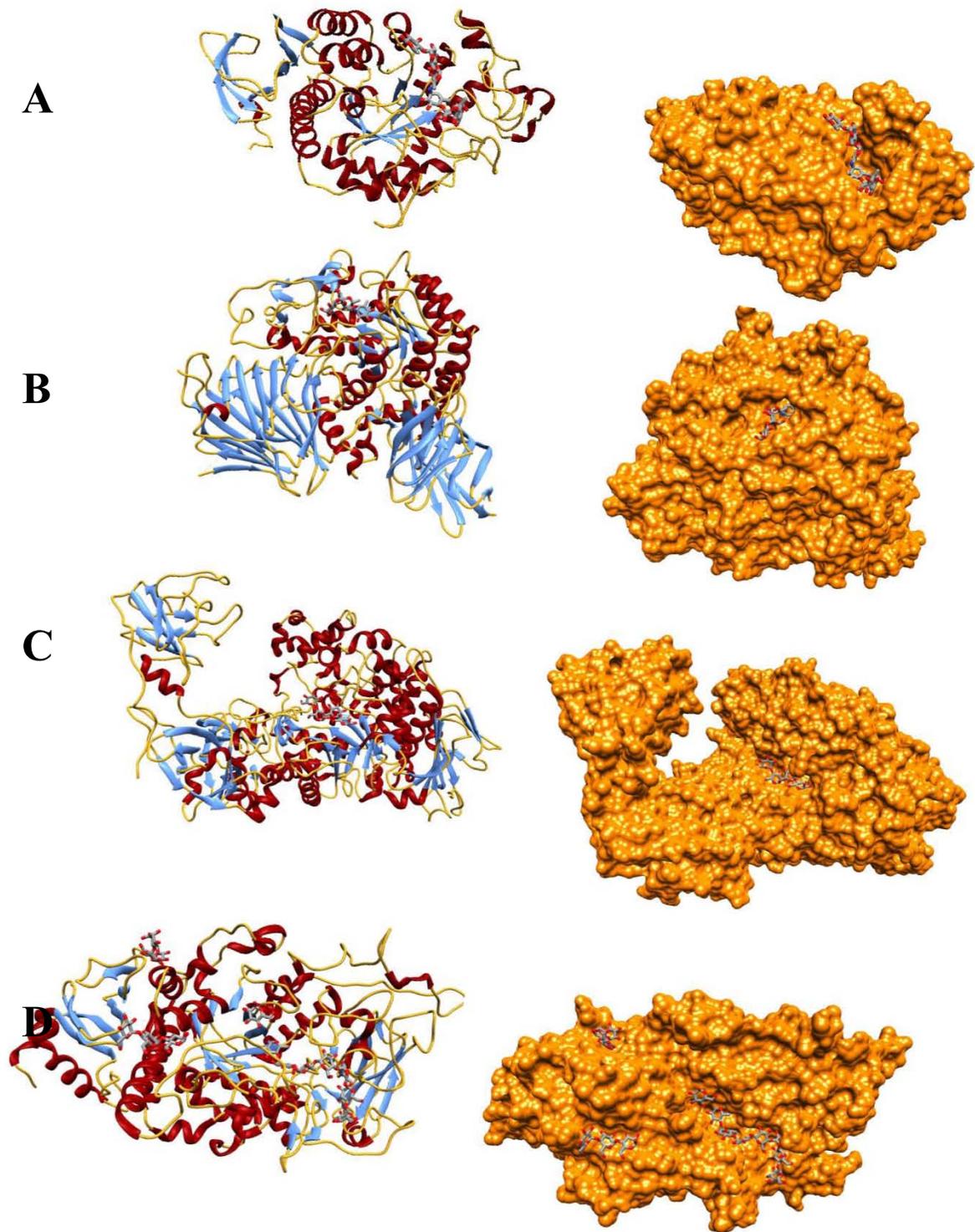


Figura 4. Representación en forma de listones y de superficie de las principales enzimas amilolíticas clasificadas funcionalmente según Henrissat (Tabla 1) Donde se muestra el sitio de unión al ligando y la forma de la cavidad. (A)  $\alpha$ -amilasa (B)  $\alpha$ -glucosidasa (C) Pululanasa (D) Isoamilasa y (E) Ciclodextrin glicosiltransferasa

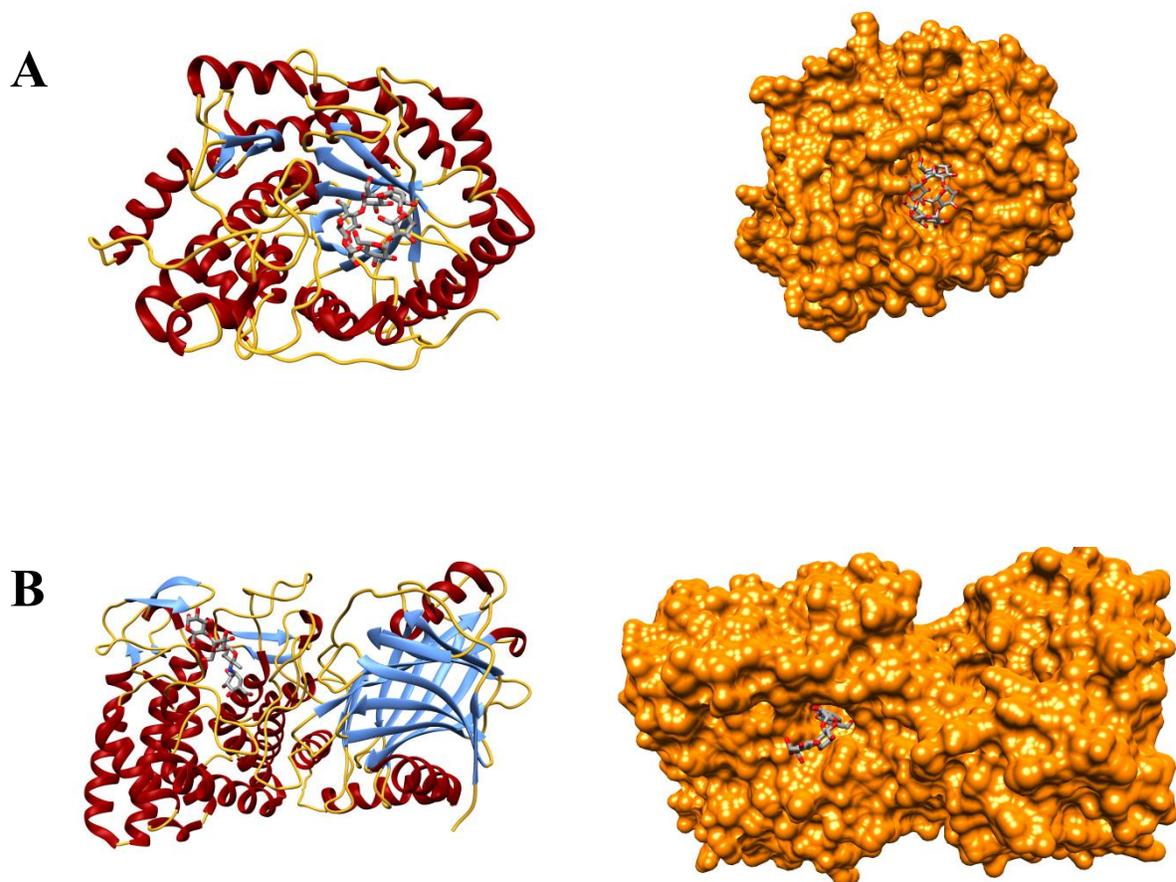


Figura 5. Representación en forma de listones y de superficie de las principales enzimas amilolíticas clasificadas funcionalmente según Henrissat (Tabla 1) Donde se muestra el sitio de unión al ligando y la forma de la cavidad. (A)  $\beta$ -amilasa (B) Glucoamilasa

### 2.3.5. Cocteles enzimáticos

Para la hidrólisis del almidón se pueden utilizar a las amilasas aisladas o una mezcla de ellas (cocteles).<sup>57</sup> Frecuentemente, en los cocteles hay un efecto sinérgico entre las hidrolasas para llevar a cabo la digestión del almidón de manera más eficiente. El efecto sinérgico ha sido observado entre dos  $\alpha$ -amilasas, una mezcla de enzimas termoestables provenientes de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus* usadas en la licuefacción del almidón de maíz, la ptialina y la pancreatina, entre otras.<sup>58</sup> También hay un efecto sinérgico de la acción hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasas y de la  $\beta$ -amilasas. La  $\alpha$ -amilasa junto con glucoamilasas convierte el almidón a glucosa rápidamente en un 99%. También se ha observado un efecto cooperativo entre glucoamilasas y pululanastas.<sup>59</sup>

## 2.4. Aplicación de amilasas

Las amilasas tienen una serie de aplicaciones biotecnológicas, en la industria agroalimentaria, textil y en medicina. Son de suma importancia para diversos procesos industriales como la preparación de jarabes de glucosa, industria azucarera, fabricación de pan y cerveza, etc. Se utilizan también en productos farmacéuticos, detergentes, en el tratamiento de aguas residuales y en alimentación animal.

El progreso científico en el campo de la genética y la enzimología ha ofrecido técnicas para mejorar el mecanismo hidrolítico de las amilasas. La motivación para estas manipulaciones radica en el deseo de querer aumentar la termoestabilidad de las enzimas, su estabilidad a un pH determinado, o bien, aumentar o disminuir la selectividad por determinados sustratos. Tales enzimas pueden ser aisladas a partir de organismos modificadas genéticamente. Por ejemplo, células de *Saccharomyces sp.* se transformaron para secretar tanto glucoamilasa de levadura y  $\alpha$ -amilasa de ratón para mejorar la hidrólisis. Varias mutantes de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* presentan modificaciones en el entorno electrostático de sus sitios activos, lo que posiblemente es determinante para cambiar el patrón de hidrólisis. La estructura de las enzimas nativas puede ser modificada por manipulación genética o mediante el uso de radiación ionizante. Las modificaciones químicas de las enzimas implican principalmente la acilación de sus grupos amino y puentes disulfuro.

## 2.5 Estructura y mecanismo de hidrólisis de las amilasas

Avances en los análisis cristalográficos han permitido analizar las similitudes estructurales entre diferentes amilasas. Se ha observado que la mayoría de las amilasas que al momento se han cristalizado poseen un sitio catalítico tipo barril  $(\beta/\alpha)_8$ , también llamado barril TIM, el cual es un motivo estructural muy conservado que consiste en ocho hélices- $\alpha$  y ocho láminas- $\beta$  paralelas alternadas en un único dominio.<sup>60, 61</sup> (Figura 6)

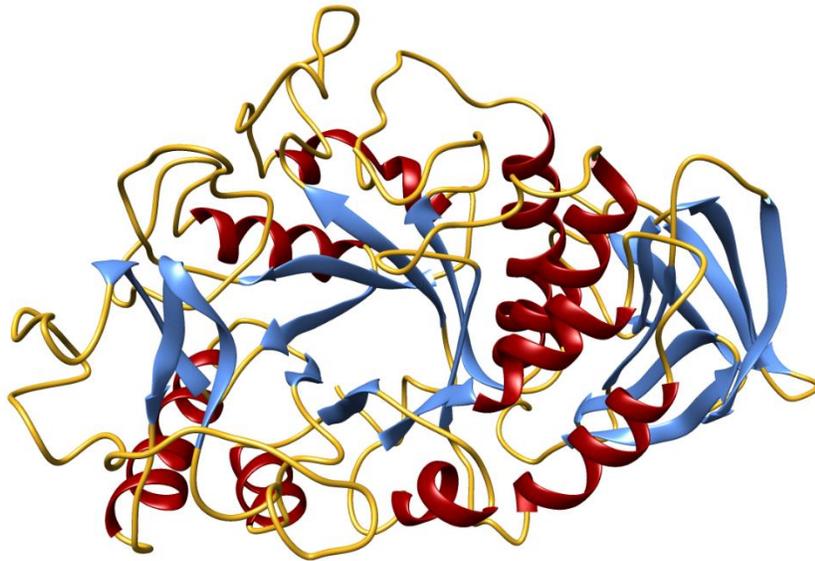


Figura 6. Estructura de la Taka-amilasa de *Aspergillus spp.* determinada por difracción de rayos X (código PDB 2TAA), en donde se observa el dominio estructural tipo barril TIM característico de este tipo de enzimas.

A partir de 1980, se han reportado diversas secuencias de aminoácidos de amilasas y enzimas relacionadas de diversos orígenes, esto ha permitido la comparación de las secuencias observando la existencia de cuatro regiones altamente conservadas en once diferentes amilasas. Estas regiones están relacionadas con los sitios catalíticos y con la especificidad de la amilasa.<sup>62-64</sup> De acuerdo con el modelo de unión al sustrato de la Taka-amilasa A, la  $\alpha$ -amilasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, propuesto por Matsuura *et al.*<sup>65</sup> (Figura 7) se observa que los residuos catalíticos son el Asp-206, Glu-230 y Asp-297. También se observan algunos aminoácidos como la Histidina que están en el sitio de unión de la enzima, los cuales están involucrados en el reconocimiento del ligando (Figura 8).<sup>66</sup>

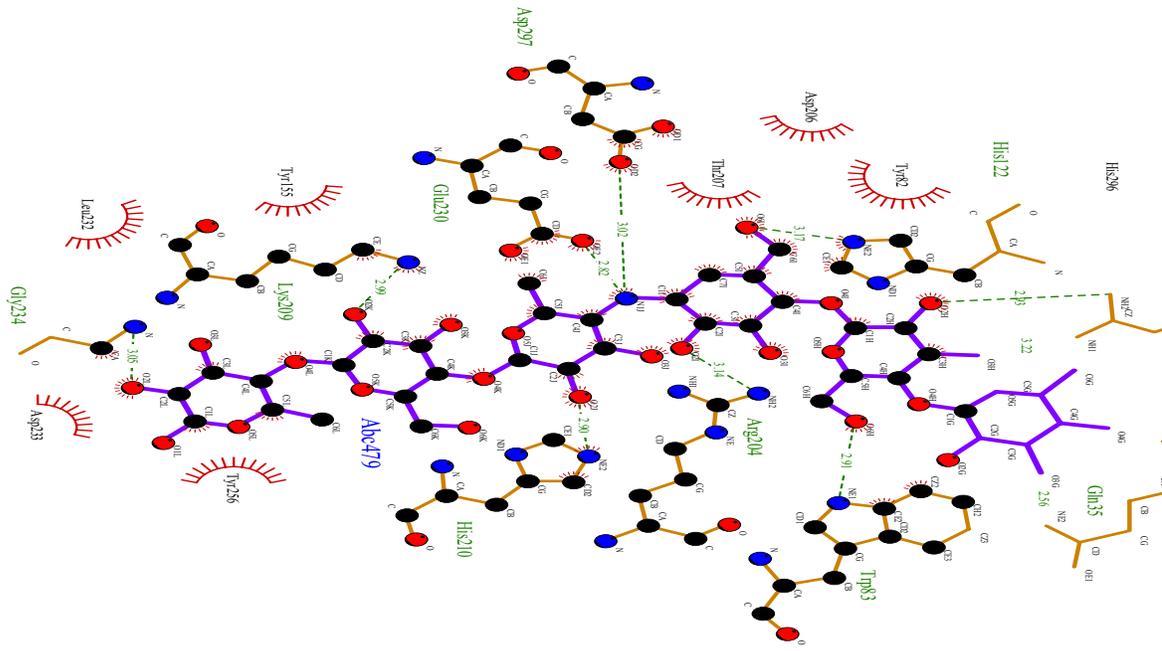


Figura 7. Interacción de los residuos catalíticos de la  $\alpha$ -amilasa con su sustrato, Acarbose (código PDB 7TAA).

<u>Enzima</u>	<u>Origen</u>	<u>Región 1</u>	<u>Región 2*</u>	<u>Región 3*</u>	<u>Región 4*</u>
<u><math>\alpha</math>-amilasa</u>	<u><i>Aspergillus oryzae</i></u>	117 DVVANH	202 GLRI DTVKH	230 E VLD	292 FVENH D
<u>CGTasa</u>	<u><i>Bacillus macerans</i></u>	135 DFAPNH	255 GIRF DAVKH	258 E WFL	324 FIDNH D
<u>Pululanasa</u>	<u><i>Klebsiella aerogenes</i></u>	600 DVVYNH	671 GFRF DLMGY	704 E GWD	827 YVSKH D
<u>Isoamilasa</u>	<u><i>Pseudomonas amyloideramosa</i></u>	292 DVVYNH	371 GFRF D LASV	435 E PWA	505 FIDVH D
<u>Enzima ramificante</u>	<u><i>Escherichia coli</i></u>	335 DWVPGH	401 ALRV D AVAS	458 E EST	521 LPLSH D
<u>Neopululanasa</u>	<u><i>Bacillus stearothermophilus</i></u>	242 DAVFNH	324 GWRL D VANE	357 E IWH	419 LLSH D
<u><math>\alpha</math>-Amilasa-pululanasa</u>	<u><i>Clostridium thermohydrosulficum</i></u>	488 DG VFNH	594 GWRL D VANE	627 E NWN	699 LLSH D
<u><math>\alpha</math>-Glucosidasa</u>	<u><i>Saccharomyces caribergensis</i></u>	106DLVINH	210 GFRF D TAGL	276 E VAH	344 YIENH D
<u>Oligo-1,6-glucosidasa</u>	<u><i>Bacillus cereus</i></u>	98 DLVVNH	195 GFRM D VINF	255 E MPG	324 YWNNH D
<u>Dextran-glucosidasa</u>	<u><i>Streptococcus mutans</i></u>	98 DLVVNH	190 GFRM D VIDM	236 E TWG	308 FWNH D
<u>Amilomaltosa</u>	<u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	224 DMWAND	291 IVRI D HFRG	332 E ELG	391 YTGTH D
<u>Enzima desramificante de glucógeno</u>	Humanos	298 DVVYNH	504 GVRL D NCHS	534 E LFT	603 MDITH D

Figura 8. Comparación de 12 amilasas con cuatro regiones altamente conservadas. Se numera la secuencia de aminoácidos de las enzimas empezando por el extremo amino hacia el carboxilo terminal. Se puede observar que hay residuos altamente conservados en este tipo de enzimas, en donde se remarca en verde los residuos catalíticos involucrados en el mecanismo de hidrólisis común de las glicohidrolasas.

A la fecha se han propuesto dos mecanismos distintos para la reacción catalítica de las glicohidrolasas, el cual se puede explicar mediante una reacción de sustitución nucleofílica entre el carbono anomérico C-1 y un nucleófilo. La cuestión es el elucidar si se lleva a cabo una reacción de Sustitución Nucleofílica del tipo 1 (SN1) o una Sustitución Nucleofílica del tipo 2 (SN2).<sup>67</sup>

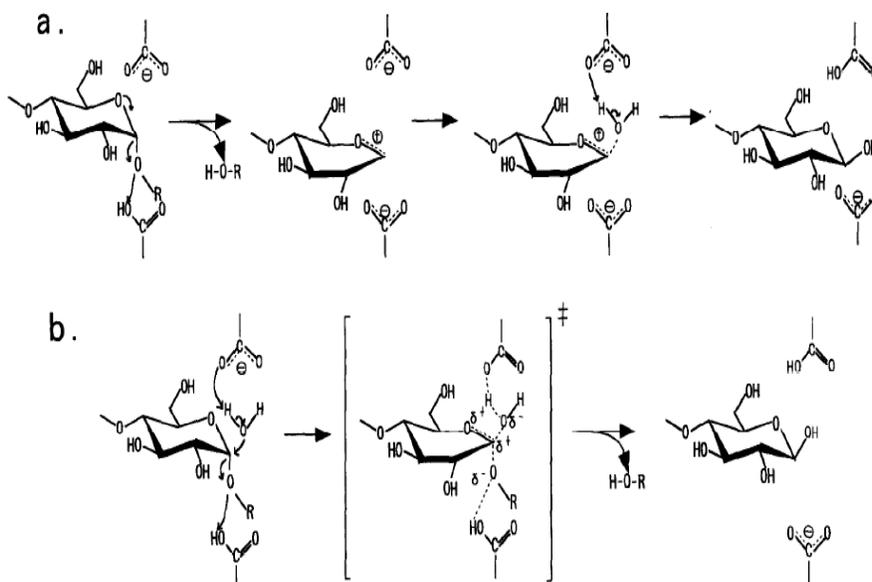


Figura 9. Posible mecanismo catalítico. (a) reacción SN1 con ión carbonio como intermediario. (b) reacción SN2 mediante la formación del complejo enzima-glicósido mediante un enlace covalente. El extremo reductor de la cadena glicosídica se indica con R.

En la Figura (9-a) se lleva a cabo una reacción tipo SN1, la cual es iniciada cuando un protón de un grupo carboxilo no ionizado ataca el oxígeno glucosídico. El fragmento del extremo reductor del sustrato, H-O-R, sale del centro catalítico. Un grupo carboxilato promueve la formación y la estabilidad del ion carbonio intermedio. El ion hidroxilo del agua, ataca nucleofílicamente al ion carbonio intermedio para finalizar la reacción. En el tipo de reacción SN2 (Figura 9-b), se lleva a cabo un ataque del carboxilato sobre el C-1 como nucleófilo, y se forma un enlace covalente entre el residuo glicósido restante y el nucleófilo catalítico a través de un estado de transición con un carácter sustancial de ion carbonio. La formación del complejo enzima-glicósido implica una primera inversión anomérica, a continuación, el ion hidroxilo del agua ataca nucleofílicamente al C-1 del lado inverso de la unión covalente del complejo formado, y finaliza la reacción. La configuración anomérica del sustrato es conservada en el producto por el mecanismo de desplazamiento nucleofílico doble.<sup>68-70</sup>

La estructura terciaria del sitio catalítico de una  $\alpha$ -amilasa mutante en presencia de su sustrato natural, muestra que la distancia que existe entre el C-1 y el grupo carboxilo que corresponde al nucleófilo catalítico es de 3Å, por lo que el contacto no es mediante un enlace.<sup>71-73</sup>

Con base a los antecedentes descritos anteriormente, Kaneko *et al.*<sup>74</sup> propone que el mecanismo catalítico de la familia de las  $\alpha$ -amilasas es por una reacción tipo SN1 (Figura 10). Se eligió a la Taka-amilasa A (*Aspergillus oryzae*) como una enzima típica de la familia  $\alpha$ -amilasa. La compleja estructura de maltoheptaosa junto con la enzima se determinó mediante un estudio de acoplamiento en tres dimensiones utilizando una simulación por computadora. La posible red de puentes de hidrógeno se caracterizó y la distancia atómica del complejo estaba en buena concordancia con los datos experimentales de los análisis cristalográficos de glicohidrolasas ya reportados, como el de la lisozima de clara de huevo.<sup>75</sup> El Glu-230 no ionizado de la Taka-amilasa retiene el puente de hidrógeno con Asp-297 a través de su protón, antes de la unión con el sustrato, maltoheptaosa (Figura 10 A). Hay muchos puentes de hidrógeno que involucran moléculas de agua alrededor de la tríada catalítica. La unión del sustrato, maltoheptaosa, a la enzima excluye las moléculas de agua de la hendidura y se rompe la red de hidrógeno original (Figura 10 B). El oxígeno glicosídico está situado cerca de Asp-297, mientras que el H-1 está cerca de Asp-206 (parte inferior de la hendidura). No había ningún otro lugar para el almacenamiento del sustrato, maltoheptaosa, excepto en la posición de acuerdo con el estudio de acoplamiento.<sup>76</sup> Los nuevos puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas entre el sustrato y los sitios de unión de sustrato se regeneran. Esto da como resultado el efecto de apantallamiento que debilita el puente de hidrógeno entre Glu-230 y Asp-297, y el pKa de Glu-230 en consecuencia se acerca al valor original. Ahora, Glu-230 libera un protón fácilmente. El protón ataca el oxígeno glicosídico para iniciar la reacción. El enlace glicosídico se rompe, y el fragmento de extremo reductor se libera de la hendidura (Figura 10 C). El Asp-206 situado en la parte inferior de la hendidura promueve la formación del ion carbonio intermedio y su estabilidad. La ionización del Glu-230 produce la fuerza electrostática de repulsión entre el Glu-230 y el Asp-297. Una molécula de agua viene de la parte relativamente exterior de la hendidura entre el Glu-230 y el Asp-297 que resulta en el debilitamiento de la fuerza de repulsión mediante la formación de un puente de hidrógeno entre los dos sitios catalíticos (Figura 10 D). El Glu-230 quita el protón de la molécula de agua para producir el ión hidroxilo activado. El ion hidroxilo del agua ataca nucleofílicamente al ion carbonio intermedio para terminar la reacción (Figura 10 E). La molécula de agua (nucleófilo) proviene sólo de la posición entre Glu-230 y Asp-297 (lado  $\alpha$ -anomérico) y nunca viene de la parte inferior de la hendidura

(lado  $\beta$ ). En efecto, el Glu-230 y el Asp-297 se encuentran en el lado relativamente exterior de la hendidura, y el Asp-206 está más profundo en la ubicación de la hendidura.<sup>76</sup> Esta es la razón por la que la  $\alpha$ -amilasa hidroliza enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídicos para producir sólo mono- y oligo- sacáridos  $\alpha$ -anomérico. Por lo tanto, se conserva la configuración original  $\alpha$ -anomérica. Se han obtenido resultados experimentales que apoyan la idea de que la molécula de agua viene y ataca a través de la ruta de acceso entre los dos sitios catalíticos.<sup>77</sup>

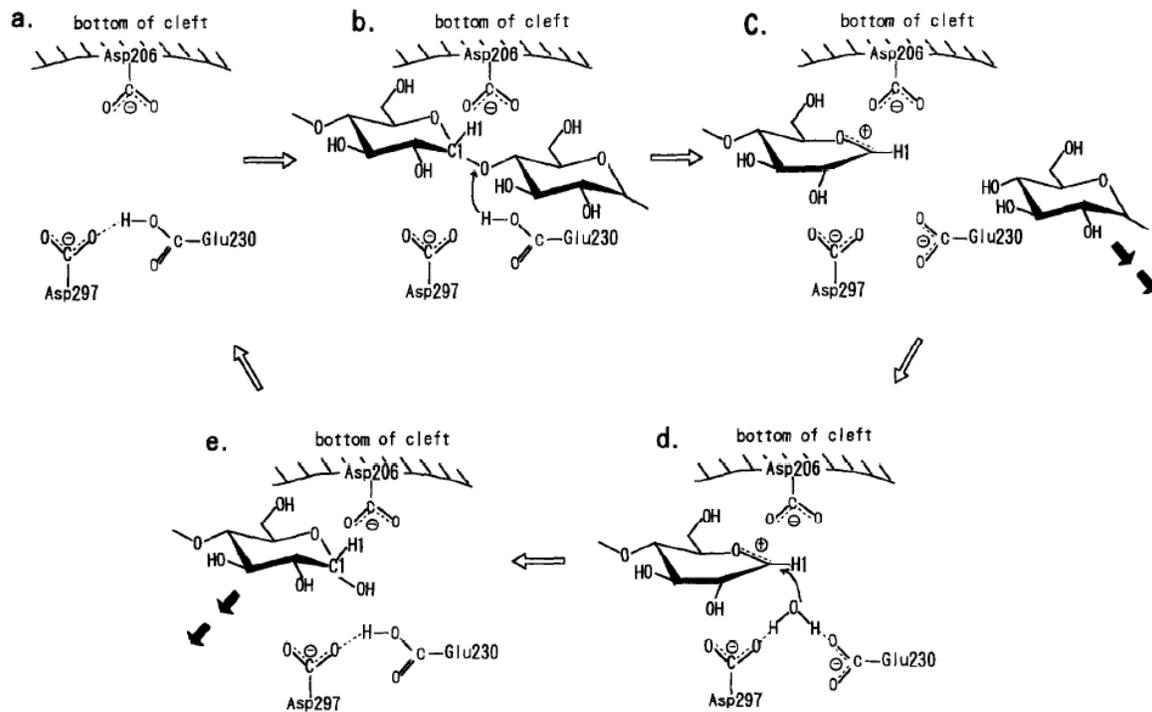


Figura 10. Mecanismo catalítico de Taka-amilasa, basado en la predicción de estructura tridimensional, mediante un acoplamiento computacional del complejo enzima-sustrato.

## 2.6 *Megathura crenulata*

*Megathura crenulata* es un gasterópodo marino comúnmente conocido como lapa, vive en grietas y espacios protegidos dentro de las rocas. Se encuentra en la zona intermareal baja y del submareal, compartiendo su hábitat con abulones y otros caracoles marinos. Se distribuye en las costas del Pacífico, desde el Condado de Mendocino en California, E.U.A. (40°N, 115°W) hasta Isla Asunción en Baja California Sur, México (27° N, 115° W). En las costas del Pacífico Mexicano se ha reportado a este gasterópodo como una de las especies importantes de la fauna de arrecifes rocosos, en donde las especies de flora dominantes son

las algas pardas *Macrocystis pyrifera* y *Eisenia arborea*, junto con algas coralinas. La fauna que se encuentra asociada a este molusco consiste de *Megastrea undosa* (Caracol panocha), *Haliotis fulgens* (Abulón azul) y *H. corrugata*.

*M. crenulata* es un organismo omnívoro, cuya alimentación consiste principalmente de algas rojas como *Corallina sp.*, *Cryptopleura sp.*, *Pterosiphonia sp.*, *Rhodymenia sp.* y algas pardas como *Cystoseira osmundacea*. Así como también, algunas especies de animales como son el tunicado *Didemnum-Trididemnum* y el hidrozoario *Eudendrium*. Las condiciones a las que puede ser sometido en su hábitat son temperaturas que alcanzan los 50°C en verano y 0°C en invierno, e incluso, un intervalo de pH entre 5 y 8.5.



#### **Posición taxonómica**

**Reino:** Animalia

**Subreino:** Metazoa

**Phylum:** Mollusca

**Clase:** Gastropoda

**Subclase:** Prosobranchia

**Orden:** Archaeogastropoda

**Familia:** Fissurellidae

**Género:** *Megathura*

**Especie:** *crenulata*

Figura 11. Lapa marina *Megathura crenulata* y su clasificación taxonómica

Recientemente se realizó un estudio identificando las enzimas digestivas producidas por las células epiteliales a lo largo del tracto digestivo de este organismo, encontrando una alta actividad de  $\alpha$ -amilasa en el saco del estilete cristalino (Figura 12).<sup>77</sup>

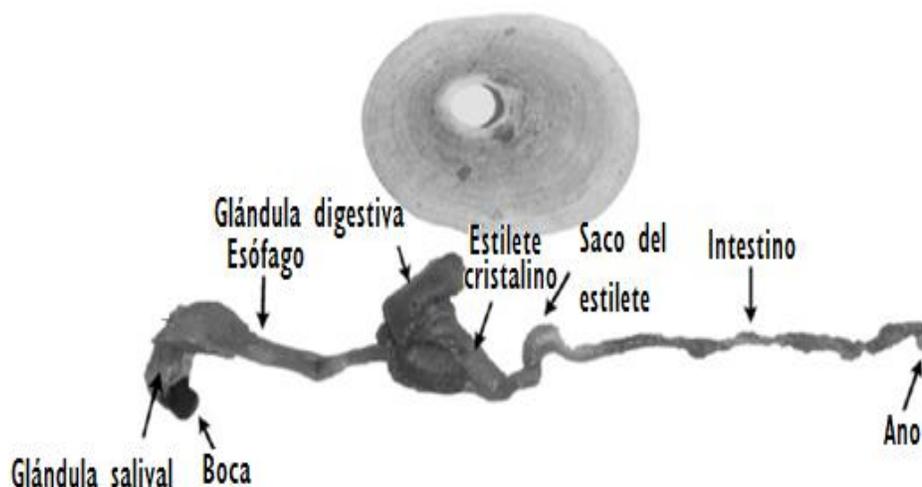


Figura 12. Tracto intestinal de *Megathura crenulata*, el cual se retiró de la concha, se desenroscó y se muestran las regiones del intestino.

El intestino del gasterópodo, como la mayoría de los animales, es un esófago que conduce desde la boca hasta el estómago seguido de un intestino largo que termina en el ano. El estómago está incrustado dentro de una glándula digestiva que se conecta al estómago por una serie de conductos. La mayoría de los trabajos de fisiología de la digestión de los gasterópodos se ha centrado en la glándula digestiva y su rol en la producción de enzimas digestivas y en la absorción de nutrientes.<sup>77</sup> La boca de los gasterópodos está localizada en la parte anterior y ventral del cuerpo, está constituida por una cavidad en forma de saco (saco radular) en el cual se encuentra la rádula, que utilizan para alimentarse; funciona como un raspador, cortador, agarrador y como cinta transportadora. La forma y el arreglo de los dientes es una adaptación al régimen de alimentación de la especie, con lo cual se identifican especies que pueden ser herbívoras, carnívoras, carroñeras, detritívoras, suspensívoras y parásitas.<sup>77</sup>

En el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 del Instituto de Química, UNAM se ha trabajado con proteínas de invertebrados marinos, particularmente moluscos y se ha observado la riqueza en enzimas glicohidrolíticas y lectinas presentes. En estos estudios se ha observado que las proteínas de estas fuentes tienen propiedades de gran importancia para su aplicación biotecnológica como son: termoestabilidad, estabilidad en amplios intervalos

de pH y con diferentes disolventes. Muchas de estas propiedades las adquieren gracias a procesos de oligomerización que permiten proteger zonas lábiles en las proteínas.<sup>78-82</sup>

### **3.0 HIPOTESIS**

La amilasa presente en el tracto digestivo de *Megathura crenulata* presenta propiedades que favorecen su aplicación biotecnológica como son actividades altas y termorresistencia.

### **4.0 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Purificar y caracterizar bioquímicamente a una amilasa de la lapa marina (*Megathura crenulata*).

#### **4.2 Objetivos Particulares**

1. Purificar una amilasa de la lapa marina (*Megathura crenulata*)

2. Determinar su pureza y masa molecular de la enzima

3. Con la proteína pura determinar:

    Óptimos de pH y temperatura para su actividad

    Especificidad

    El efecto de diversos aditivos sobre la estabilidad funcional y estructural

    La termorresistencia de la enzima

4. Realizar estudios conformacionales y determinar el contenido de estructura secundaria de la amilasa pura

## 5.0 MÉTODOS

### 5.1 Tratamiento del material biológico

En el presente estudio se trabajó con el molusco marino *Megathura crenulata*, también conocido como lapa marina. Estos organismos se colectaron en la Bahía de Todos Santos, Ensenada Baja California, México. Los organismos se transportaron vivos al Instituto de Química, UNAM, donde se congelaron a  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La extracción y purificación de la enzima se realizó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar su desnaturalización. El tracto digestivo completo (Figura 12) se homogenizó en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. El homogenado se centrifugó a  $30000 \times g$  por 30 minutos en una centrífuga Beckman J2-21. Al sobrenadante se le adicionó azida de sodio a una concentración final de 0.05% (m/v) para evitar crecimiento microbiano. Para determinar si el extracto presentaba la actividad amilolítica, está se midió utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) como se describe a continuación.

### 5.2 Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilolítica se determinó mediante la cuantificación de los azúcares reductores utilizando la técnica del DNS. Esta técnica de óxido-reducción se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo) a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico (color ámbar) por la presencia de azúcares reductores en un medio alcalino (Figura 13), mientras que los grupos aldehído de los carbohidratos son oxidados a carboxilos.<sup>83</sup> El fundamento de esta técnica consiste en la oxidación de la glucosa, sin embargo, la glucosa en solución acuosa se encuentra en su forma cíclica que es muy estable y por lo tanto, no reacciona. Por esta razón, es necesario calentar la muestra para que el anillo se abra dejando expuesto el aldehído dando lugar a una reacción de oxidación. La intensidad en el color ámbar es proporcional al contenido de azúcares reductores en la muestra y es leído en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Para que ocurra la reacción es necesario proporcionar un medio alcalino; esto es posible gracias a la adición de NaOH el cual es una base fuerte. En solución acuosa se ioniza liberando  $\text{Na}^+$  y  $\text{OH}^-$  al medio, el cual se alcaliniza, permitiendo la oxidación de la glucosa; en esta oxidación, el carbono del grupo aldehído se convierte en un ácido carboxílico por la pérdida de hidrógenos y la ganancia de oxígeno, obteniéndose de esta

forma el ácido glucónico; por otro lado, el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido gracias a la acción del tartrato de sodio y potasio y de la oxidación de la glucosa. El ácido pierde una de sus configuraciones 3 ó 5, principalmente la 3 por ser más reactiva, quedando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, el cual produce una coloración de amarillo a rojo-café. La coloración es proporcional a la concentración de glucosa.

La actividad específica (U/mg) fue definida como los micromoles de maltosa liberados por minuto por miligramo de proteína.

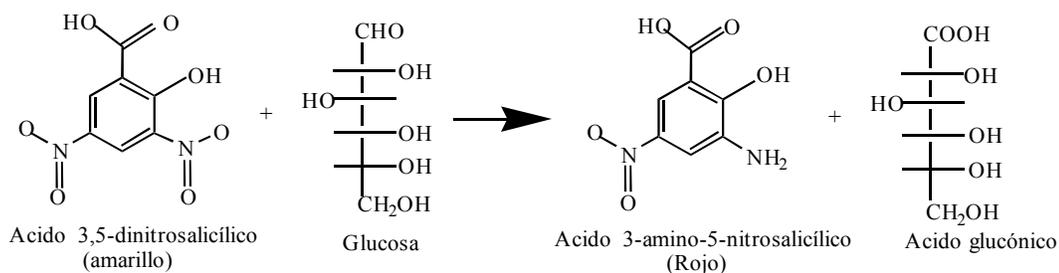


Figura 13. Reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la formación del ácido-3-amino-5-nitrosalicílico, el cuál absorbe a una longitud de onda de 550 nm.

### 5.2.1. Preparación del reactivo DNS

Se disolvieron 3.53 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 6.6 g de NaOH en 472 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionaron 102 g de tartrato de sodio y potasio, 2.3 ml de fenol (fundido en baño María) y 2.76 g de metabisulfito de sodio. Estos reactivos se mezclaron y almacenaron a 4°C en un recipiente que impidiera el paso de la luz.

### 5.2.2 Curva patrón de maltosa

Para determinar la actividad específica de la amilasa se preparó por triplicado una serie de diluciones con concentraciones conocidas de maltosa y se utilizó el método del DNS para cuantificar los azúcares reductores. El tratamiento aplicado a los estándares fue el siguiente:

Se mezcló en un tubo 1 mL de estándar con 1 mL de reactivo DNS. Los tubos fueron puestos en baño de agua a ebullición por 10 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Las absorbancias fueron leídas a 550 nm comparando contra un blanco de solución amortiguadora de acetatos 50 mM pH 6.

### 5.2.3 Tratamiento de la muestra

Para determinar la actividad en las diferentes muestras se utilizó almidón al 0.5% (p/v) en un amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 como sustrato. Para cada muestra se prepararon dos blancos, el blanco de muestra que nos permitió determinar si en la muestra ya había azúcares reductores libres que no fueran producto de la actividad de la enzima y el blanco de sustrato que nos permitió evaluar si había auto hidrólisis del sustrato ya sea por el pH o por la temperatura.

Los tubos de reacción se prepararon de la siguiente manera:

1. *Blanco de proteína*: 100  $\mu$ L de muestra y 400  $\mu$ L de solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 6.
2. *Blanco de sustrato*: 250  $\mu$ L de almidón al 0.5% y 250  $\mu$ L de solución amortiguadora de acetatos 50 mM pH 6.
3. *Muestras*: 250  $\mu$ L de almidón al 0.5 %, 150  $\mu$ L del amortiguador acetatos 50 mM pH 6 y 100  $\mu$ L de enzima. El volumen total de reacción fue de 500  $\mu$ L.

Todos los tubos se incubaron a 30°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó a cada tubo 500  $\mu$ L del reactivo de DNS y se llevó a ebullición por 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm. Este valor de absorbancia se interpoló en una curva patrón elaborada con maltosa. Una unidad de actividad (U) se define como los micro moles de maltosa liberados por minuto a 30°C. La actividad específica se define como la actividad entre la concentración de proteína en la muestra (U/mg).

### 5.3 Cuantificación de Proteína

Para la cuantificación de proteína total se utilizó el método de Smith y Krohn,<sup>84</sup> el cual emplea el reactivo BCA (Protein Assay Reagent de PIERCE), que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la reacción de proteínas con  $\text{Cu}^{+2}$  en un medio alcalino (produciendo  $\text{Cu}^{+1}$ ), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para  $\text{Cu}^{+1}$ , llamado ácido bicinónico. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), éste es soluble en agua y

exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el valor de absorbancia en una curva de calibración elaborada con albúmina de suero de bovino a diferentes concentraciones.

Para la elaboración de dicha curva se preparó por triplicado una serie de diluciones con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Se colocaron 50  $\mu$ L de cada estándar en tubos apropiadamente marcados, utilizando 50  $\mu$ L del diluyente como blanco. Se adicionó a cada tubo 1 mL del reactivo de trabajo (El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes del reactivo A del kit de BCA con una parte del reactivo B. Este reactivo se debe preparar el día de su uso). Se mezcló e incubó por 30 min a 60°C. Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Este método permite detectar de 5 a 250  $\mu$ g/mL de proteína.

## **5.4 Purificación de una amilasa de *M. crenulata***

### ***5.4.1 Cromatografía de afinidad***

En estudios previos en el grupo de trabajo se observó que las amilasas presentes en el aparato digestivo de algunos moluscos marinos presentan un dominio que reconoce al agar sin hidrolizarlo. El agar está presente como un carbohidrato constitutivo de la pared celular de las algas café, de las cuales se alimentan estos moluscos. Estructuralmente, es una compleja mezcla compuesta por dos fracciones principales: la agarosa y la agarpectina.

Utilizando este reconocimiento por el agar, se diseñó una técnica de purificación por afinidad, sencilla, rápida y económica. Se preparó agar al 2% en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6, se calentó y dejó que gelificara. El gel se cortó en cuadros de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>. Se dejó interaccionar el sobrenadante del extracto del hepatopáncreas de *Megathura crenulata* con los cubos de agar durante 20 min, posteriormente se realizaron lavados con amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 para eliminar las proteínas que no presentan reconocimiento por el agar, estos lavados se realizaron hasta tener una absorbancia a 280 nm cercana a cero. Posteriormente se realizaron eluciones con el mismo amortiguador, pero con dos concentraciones de NaCl 1M y 1.5M para romper la interacción agar-proteína y se pueda eluir, por último se realizaron lavados con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con 0.2 M de NaCl con la intención de modificar el pH y eluir las proteínas que hayan tenido una interacción muy

fuerte con el agar y no se haya eluido con la sal. A todas las fracciones se les midió la absorbancia a 280nm para estimar el contenido de proteína eluída y se les midió la actividad amilolítica para determinar en que fracción teníamos a la amilasa.

#### ***5.4.2 Cromatografía de exclusión molecular***

Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una resina de Ultrogel AcA 202 que separa proteína en un intervalo de masa molecular de 1-22 kDa. La columna se equilibró con 2 volúmenes de un amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con 0.2M de NaCl, para evitar adsorción no específica.

### **5.5 Determinación de la masa molecular y pureza de la proteína mediante espectrometría de masas MALDI-TOF**

Para determinar la masa molecular de las proteínas y establecer su pureza, se utilizó la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization coupled with a time-of-flight mass analyzer/ ionización láser asistida por una matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo) en un equipo Microflex Bruker Daltonics.

La espectrometría de masas es un método de ionización suave utilizado en la determinación de las masas de macromoléculas y se caracteriza porque la muestra está embebida en una matriz química en exceso. En esta técnica, la muestra de proteína se mezcla y seca junto con una matriz que absorbe el calor de un haz láser usado como fuente de desorción o ionización. La luz del láser pulsado golpea la muestra sólida calentándola y vaporizándola, ionizando así los compuestos con una mínima descomposición, con lo que es posible observar el espectro que caracteriza la relación masa/carga de la muestra.<sup>85</sup>

La proteína pura se mezcló con la matriz Súper DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzóico) disuelta en una solución de 30% de acetonitrilo, 70% agua y 0.1% de ácido trifluoroacético v/v. El procedimiento empleado para preparar las muestras fue el de la gota seca, en el cual 5  $\mu$ L de la matriz se mezclaron con 1  $\mu$ L del analito (concentración mínima de 50 picomoles/ $\mu$ L) y se dejaron secar para formar un depósito sólido en la placa de lectura, misma que fue introducida al espectrómetro de masas.

## 5.6 Parámetros óptimos de actividad

### 5.6.1 Temperatura óptima

Para conocer la temperatura óptima de la actividad amilolítica, se utilizó el método del DNS (Ver párrafo 5.2). Las mediciones se realizaron por triplicado, las temperaturas probadas fueron: 4°C, 10°C, 18°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C.

### 5.6.2 pH óptimo

De igual manera que para el óptimo de temperatura, se utilizó el método DNS (Ver párrafo 5.2). Los amortiguadores que se utilizaron en este estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Amortiguadores utilizados para determinar el óptimo de actividad de la amilasa de *M. crenulata*

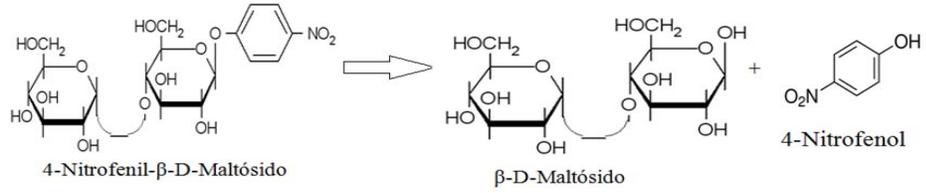
Solución amortiguadora	pH
Fosfatos 50mM	2, 3 y 4
Acetatos 50mM	5 y 6
Fosfatos 50mM	7 y 8
Tris-NaOH	9 y 10

## 5.7 Determinación de la especificidad

Para determinar la especificidad de la amilasa purificada se utilizaron 3 sustratos sintéticos (*p*-nitrofenil oligosacáridos cromogénicos) derivados de ciclodextrinas que son específicos para la hidrólisis de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  amilasa. La hidrólisis de estos sustratos genera la formación de un sacárido y del 4-nitrofenol, el cuál en condiciones alcalinas forma el fenolato que absorbe a una longitud de onda de 405nm. Los sustratos sintéticos utilizados fueron 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Maltósido, 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-Maltósido y 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Glucopiranosido que son específicos para la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  amilasa respectivamente. La hidrólisis de cada sustrato se muestra en la Figura 14.

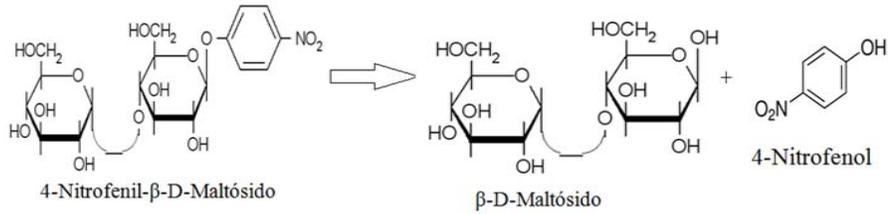
- **$\alpha$ -amilasa:**

4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Maltósido



- **$\beta$ -amilasa:**

4-Nitrofenil- $\beta$ -D-Maltósido



- **$\gamma$ -amilasa:**

4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Glucopiranosido

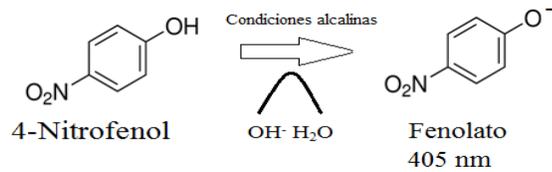
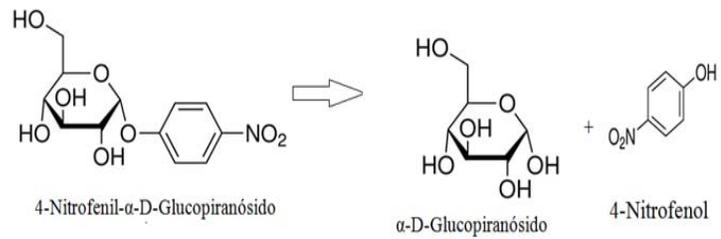


Figura 14. Hidrólisis de los diferentes sustratos específicos por las tres principales amilasas

### **5.7.1 Procesamiento de las muestras**

Se preparó cada uno de los tres sustratos sintéticos a una concentración de 5mM en un amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6. Para los blancos se mezclaron 200  $\mu$ L de solución amortiguadora y 200  $\mu$ L del sustrato sintético. A las muestras se les adicionó 200  $\mu$ L de la muestra y 200  $\mu$ L del sustrato sintético. Los ensayos se realizaron por triplicado, incubando a 30 °C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 200  $\mu$ L de NaCO<sub>3</sub> para generar el medio alcalino y que se detenga la reacción. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

Para poder conocer la concentración del *p*-nitrofenol generado en la reacción de hidrólisis, se utilizó la ecuación de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol (18300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Ley de Lambert-Beer:

$$A=alc$$

*A*= Absorbancia

*α*=Coeficiente de extinción molar

*l*= Paso de luz (longitud de la celda)

*C*= Concentración

La actividad específica (U/mg) fue definida como los micromoles de *p*-nitrofenol formado por minuto por miligramo de proteína.

### **5.8 Cuantificación de carbohidratos totales**

Para determinar si la proteína estaba glicosilada y determinar el contenido de carbohidratos totales se utilizó el método espectrofotométrico “fenol-sulfúrico”.<sup>86</sup> La curva de calibración se realizó utilizando glucosa como estándar. La concentración de azúcares totales se expresa como  $\mu$ g glucosa/mL.

En este ensayo se mezclaron 500  $\mu$ L de la enzima con 15  $\mu$ L de fenol al 5%, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 1.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Después de incubar por 20 min a 27 °C se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como blanco se utilizó el amortiguador de acetatos 50 mM pH 6.

## **5.9. Efecto de aditivos sobre la actividad**

Algunas sales, iones metálicos, azúcares, polímeros, agentes reductores, etc. pueden provocar diversos efectos sobre la actividad amilolítica de la proteína, algunos pueden interaccionar de manera favorable con la enzima favoreciendo la unión al sustrato, mientras que en otros casos, puede provocar inhibición en la actividad.

El organismo de estudio (*Megathura crenulata*) al ser un organismo marino, se esperaba que algunos iones tengan cierto efecto sobre la actividad amilolítica, ya que se encuentran en las condiciones naturales en las que se encuentra la lapa marina. Además se probó el efecto de un agente reductor como Ditioneitol (DTT) el cual es capaz de reducir los puentes disulfuro (-S-S-) presentes en las proteínas a grupos sulfhidrilo (-SH), un agente quelante como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), agentes solubilizantes como Polietilenglicol (PEG) con un grado de polimerización de 3350, 400, etc. Los aditivos utilizados fueron los siguientes:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ , EDTA, Sorbitol, Manitol, Etanol, PEG-400 y PEG 3350 + 25% Citrato.

## **5.10 Determinación de la estabilidad de la amilasa de *M. crenulata***

La producción a gran escala de proteínas depende en gran medida de su estabilidad en el medio en que cumple con su función ya que una baja estabilidad conduce a bajos rendimientos de purificación, debido a la degradación y precipitación. Además, numerosos estudios y aplicaciones biotecnológicas requieren que la proteína esté estable estructural y funcionalmente bajo condiciones extremas de pH, temperatura, a altas concentraciones y por periodos largos de tiempo. Es por esto que es necesario conocer los óptimos de estabilidad conformacional y funcional de una proteína.

### ***5.10.1 Efecto de la temperatura en la estabilidad funcional de la amilasa de *M. crenulata****

Para evaluar la estabilidad funcional de la amilasa, la proteína pura se incubó durante 1 hora en las siguientes temperaturas: 4°C, 10°C, 25°C, 37°C, 45°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C. Posteriormente, se midió la actividad amilolítica por el método de DNS (Ver 5.2) a un pH de 6.0 y 37°C.

### ***5.10.2 Evaluación de la estabilidad de la amilasa por fluorometría diferencial de barrido***

La estabilidad térmica es una característica importante que necesita ser probada bajo diferentes condiciones de pH, concentración de sal, tipo de amortiguador y con una variedad de aditivos. La identificación de una solución estabilizante aumenta la capacidad de purificar, concentrar y cristalizar la proteína.

El ensayo de estabilidad térmica basada en la fluorescencia o fluorometría diferencial de barrido (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) fue desarrollado por Pantoliano y colaboradores en 2001<sup>87</sup> y registrada como una marca comercial farmacéutica de 3 dimensiones (3DP) pero posteriormente se le llamó comúnmente termofluor. La metodología aprovecha el hecho de que la fluorescencia de muchos fluoróforos que se unen a proteínas de manera no específica se incrementa cuando la hidrofobicidad del medio aumenta. En esta técnica, el fluoróforo interactúa con las regiones hidrofóbicas expuestas generadas por el desplegamiento parcial o total de la proteína. El fluoróforo se apaga en soluciones acuosas pero cuando las fracciones aromáticas de los fluoróforos se intercalan en el núcleo hidrofóbico este recupera su fluorescencia.

ThermoFluor es un ensayo de estabilidad de proteínas que utiliza un fluoróforo sensible al medio para monitorear la cantidad de proteína desplegada en solución como una función de la temperatura. Cuando la temperatura se incrementa, la fracción de proteína no nativa se incrementa generando una transición cooperativa de desplegamiento. La temperatura media de tal transición o  $T_m$  se define como la temperatura en la que la concentración de proteína nativa y no nativa es equivalente ( $[N] = [U]$ ) y el equilibrio entre estas especies es  $K_U = [U]/[N] = 1$ . Debido a esto, la energía libre es cero dado que  $\Delta_U G(T_m) = -nRT \ln K_U$ . Bajo condiciones en las que el desplegamiento es reversible se puede tener información de la entalpía de desplegamiento,  $\Delta_U H(T_m)$ , y de la capacidad calorífica de desplegamiento,  $\Delta_U C_p$ , proporcionando una descripción completa de la dependencia de la temperatura en la estabilidad de las proteínas.<sup>3</sup> Debido a la simple relación entre  $T_m$  y  $\Delta_U G(T)$  para la energía libre de desplegamiento de la proteína, los efectos de la composición de la solución en la  $T_m$  pueden ser directamente relacionados con los cambios en la estabilidad de la proteína.<sup>87, 88</sup>

En la DSF, la proteína se calienta mediante un instrumento de RT PCR en presencia de un fluoróforo, para monitorear los cambios estructurales inducidos térmicamente en la proteína.

Los fluoróforos que se utilizan son principalmente sensibles a la polaridad del disolvente y emiten una señal de fluorescencia en un ambiente no polar como los grupos hidrofóbicos expuestos de proteínas desplegadas y se apagan o inactivan rápidamente en soluciones acuosas. A la fecha SYPRO Orange es el fluoróforo más utilizado debido a su alta relación señal-ruido y a la alta especificidad y sensibilidad hacia regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas.<sup>87</sup>

Para muchas proteínas, el incremento gradual de la temperatura tiene poco efecto en el plegamiento de la misma, hasta que se alcanza una temperatura donde esta se despliega rápidamente. En este punto, la proteína desplegada expondrá su núcleo hidrofóbico y emitirá una señal de fluorescencia (Figura 15). En un caso ideal, el despliegue repentino de la proteína de la muestra dará lugar a un fuerte aumento de la señal de fluorescencia en un intervalo de temperatura corto. Una curva sigmoide aguda permite el cálculo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ), que corresponden a la temperatura a la que la proteína está 50% plegada y 50% desplegada. La temperatura de fusión también puede ser obtenida calculando el pico de la primera derivada (Figura 15 B). Se ha observado que una curva de fusión aguda es altamente reproducible lo que abre la posibilidad de comparar las temperaturas de fusión entre las muestras de proteína en diferentes amortiguadores, o con diferentes aditivos, entre otras variables. Un cambio positivo en la  $T_m$  puede relacionarse con un aumento en el orden de la estructura y disminución en la flexibilidad, mientras que  $T_m$  más baja indica que la proteína en esas condiciones pierde estructura.<sup>87, 88</sup>

### ***Procesamiento de la muestras***

La proteína se utilizó a una concentración de 0.15 mg/mL. A 1mL de ésta se le adicionó 1 uL del reactivo SYPRO Orange (dilución 1:1000). Se colocaron 10  $\mu$ L de la muestra en cada pozo de una placa de 96 pozos de Applied biosystems (MicroAmp Fast 96-well reaction plate de 0.1 mL). A cada pozo se le adicionaron 10  $\mu$ l de cada solución de los tres diferentes kits probados: pH/sales amortiguadoras, solubilidad/estabilidad y aditivos. Cada kit consta de 96 condiciones. La placa se selló con una película ópticamente inerte (Greiner VIEWseal de Jena Bioscience). Posteriormente, se centrifugó la micro placa por 2 min a 300 rpm a 25 °C y se colocó en el equipo de PCR en tiempo real (Applied Biosystems StepOne). Para el análisis se aplicó un gradiente de temperatura de 25-98 °C

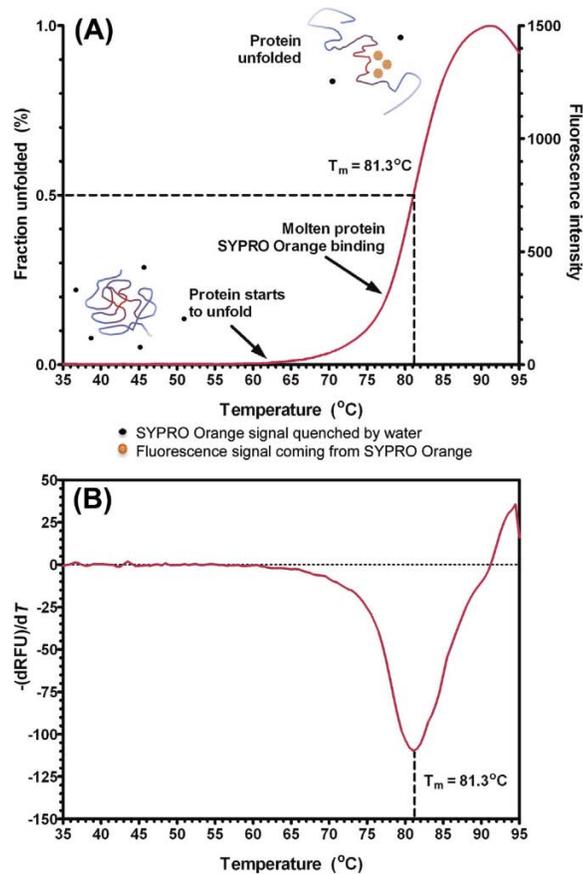


Figura 15. Ensayo de desnaturalización térmica típico usando termofluorescencia. (A) Curva de fusión de la glucosa isomerasa en 100 mM de Tris-HCl pH 8.5. La solución de proteína se calentó en presencia de SYPRO Orange. Cuando la proteína empieza a desnaturalizarse, la sonda fluorescente se une al núcleo hidrofóbico de la proteína incrementando la fluorescencia (eje Y derecho). La máxima fluorescencia se obtiene cuando la proteína se despliega por completo, después la señal del SYPRO Orange decrece cuando el fluoróforo se disocia de la proteína. Una señal residual de este se explica por la interacción con agregados de proteína. Generalmente, la señal de fluorescencia es graficada como una función de la temperatura que genera una curva sigmoide que permite determinar la fracción de proteína desplegada (eje Y izquierdo). El punto de inflexión corresponde a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) en la cuál el 50% de la proteína está desplegada. En este caso la  $T_m$  fue de  $81.3^\circ\text{C}$ . (B) Representación alternativa de la curva de fusión utilizando la primera derivada de los datos crudos  $-(dRFU)/dT$  de los datos crudos. La  $T_m$  corresponde con el ápice.

### **5.11 Estudio conformacional y determinación del contenido de estructura secundaria de la amilasa mediante dicroísmo circular**

La aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad de los aminoácidos que la conforman. La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Neumann y Snatzke en 1990.<sup>89</sup> Esta técnica utiliza las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra, induce un desfase y un cambio de magnitud en ambos componentes circularmente polarizados. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\alpha$  y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, obteniendo un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda ( $\lambda$ ).<sup>89</sup>

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm), de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina y fenilalanina. La asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno ya que los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son sensibles a los cambios en la misma. Por otro lado, los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, hojas beta, giros y lazos (Figura 16)).<sup>89</sup>

El espectro de DC se puede expresar como el grado de elipticidad ( $\theta$ ) y normalmente se expresa en miligrados (mdeg) debido al tamaño tan pequeño de algunas mediciones.

$$(\theta) = \tan^{-1}(b/a) \quad \Delta A = \theta / 32.982$$

Se puede expresar en elipticidad molar  $[\theta]$  como  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  :

$$[\theta] = \theta / 10 (C \times L) \quad \Delta \epsilon = [\theta] / 3298,2$$

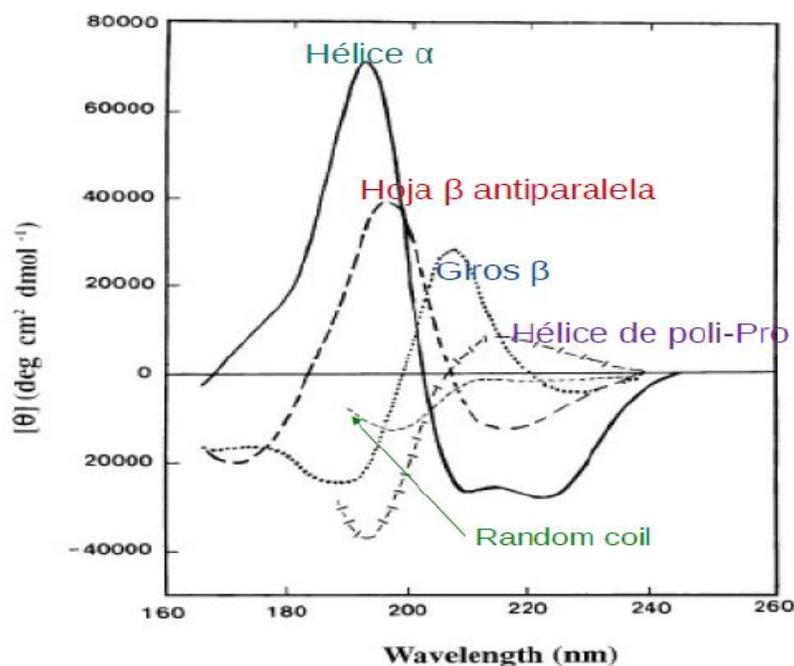


Figura 16. Patrón característico de proteínas con determinada estructura secundaria, en donde se observan los puntos máximos y mínimos determinantes.

El contenido de estructura secundaria de la amilasa pura se determinó por sus espectros de dicroísmo circular. Dichos espectros se obtuvieron a 20 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700. Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm de paso de luz para la región del ultravioleta (UV) lejano (185-260 nm) y las lecturas fueron registradas cada 1 nm. Las muestras que se encontraban a una concentración de 0.25 mg/mL se dializaron contra un amortiguador de acetatos 10 mM pH 6.0, como blanco se realizó una corrida con dicho amortiguador en las mismas condiciones. Los resultados se expresan como elipticidad molar por residuo medio  $[\theta]$ .

## 5.12 Pruebas de actividad hemaglutinante

Para verificar si la amilasa tenía actividad de lectina, se realizó una prueba de aglutinación de eritrocitos de conejo formalinizados (ECF). Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de aglutinar células, en especial células como los eritrocitos, esto debido a que reconocen los azúcares presentes en la membrana celular.<sup>81,82</sup> Las pruebas se realizaron en placas de 60 micropozos con fondo en forma de “U” por el método de dilución seriada 1:2, esto es, en cada uno de los pozos se colocaron 50  $\mu$ L de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 6.0, a continuación, en el primer pozo de cada serie se colocaron 50  $\mu$ L de la solución de proteína, se mezcló con el amortiguador y posteriormente se tomaron 50  $\mu$ L que fueron trasladados al segundo pozo, de nuevo se mezcló con el amortiguador ya presente y se tomaron otros 50  $\mu$ L para llevarlos al tercer pozo y así sucesivamente hasta completar la hilera de 12 pozos o hasta donde fuese necesario para agotar la actividad. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu$ L de la solución de ECF al 2%, se agitaron brevemente las cajas, se taparon y se dejaron a temperatura ambiente por 1.5 h, transcurrido ese tiempo se examinaron visualmente en busca de hemaglutinación. La actividad queda entonces definida como el recíproco del título, que corresponde al factor de dilución (número de pozo) más alto de proteína que presenta actividad hemaglutinante. La actividad específica se expresó como U/ $\mu$ g de proteína.

La actividad se midió con este método por triplicado incluyendo un blanco positivo, en el que se utilizó una lectina comercial, y un blanco negativo, en que se sustituyeron las muestras por amortiguador de acetatos 50 mM pH 6.0. El patrón de sedimentación de los eritrocitos que indica hemaglutinación es una capa uniforme de eritrocitos en la base de los pozos mientras que un patrón negativo, que indica que no hay actividad hemaglutinante, es un agregado de eritrocitos al fondo de los pozos rodeados de una zona clara y concéntrica de igual tamaño que la del blanco negativo (Figura 17).



Figura 17. Pruebas de actividad hemaglutinante dónde a) indica que no existe actividad mientras que b) muestra la presencia de actividad hemaglutinante

### **5.13 Determinación de la especificidad**

Para determinar la especificidad de la lectina se realizaron pruebas de inhibición, probando qué carbohidratos eran capaces de inhibir la actividad hemaglutinante de la lectina sobre los ECF. Dichas pruebas se realizaron con diluciones seriadas de los carbohidratos para así probar un amplio margen de concentraciones. Se utilizaron placas de 60 micropozos en los que se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6.0. A continuación, en el primer pozo de cada serie se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de los distintos azúcares a probar y se realizaron diluciones seriadas 1:2 de los mismos hasta llegar a 12 diluciones. Posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la lectina purificada a una concentración de 55  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Con estas soluciones, las cajas se taparon y se sometieron a agitación suave a temperatura ambiente por 1 hora. Al concluir el tiempo de incubación, se adicionó a cada pozo 25  $\mu\text{L}$  de la solución al 2 % de ECF. Bajo las mismas condiciones, se prepararon simultáneamente un blanco positivo y uno negativo para cada azúcar, el positivo contenía 35  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6.0, 25  $\mu\text{L}$  de cada dilución de azúcar a probar y 25  $\mu\text{L}$  de ECF al 2 %, mientras que el negativo contenía 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos 50mM pH 6.0, 10  $\mu\text{L}$  de la solución de lectina y 25  $\mu\text{L}$  de ECF al 2 %, los ensayos se realizaron por triplicado.

Se probaron 55 azúcares (monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos) se consideró que la dilución mínima inhibitoria de la actividad era el último pozo en el que visualmente el sedimento de eritrocitos al fondo de los pozos y la zona clara y concéntrica alrededor de estos, era de igual tamaño que la del blanco positivo; la concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como aquella presente en dicho pozo.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Purificación**

Se estandarizó un método para la purificación de una amilasa del tracto digestivo de *Megathura crenulata*. La purificación se pudo hacer en un solo paso uniendo la amilasa a agar polimerizado, utilizando la propiedad que tiene esta proteína de poseer un dominio de reconocimiento a dicho polisacárido. La proteína se une fuertemente al agar y sólo después de lavar con 2 M de NaCl pudo ser eluída. Este resultó ser un método muy sencillo y de bajo costo para purificar a la amilasa y para poder mantenerla estable. Es importante señalar que

por métodos convencionales de purificación, esto es, por cromatografías de intercambio iónico, etc, la proteína perdía la actividad en muy poco tiempo, se agregaba y precipitaba. Sin embargo con esta técnica, la proteína se mantiene estable y con una de las actividades específicas más altas reportadas a la fecha (41,500 U/mg) para este tipo de enzimas.

La cuantificación de la proteína se realizó con la técnica del BCA como se describió en los métodos y utilizando la curva de calibración que se muestra en la Figura 18. Para la cuantificación de la actividad específica se elaboró una curva patrón con maltosa (Figura 19) (ver secciones 5.2 y 5.3).

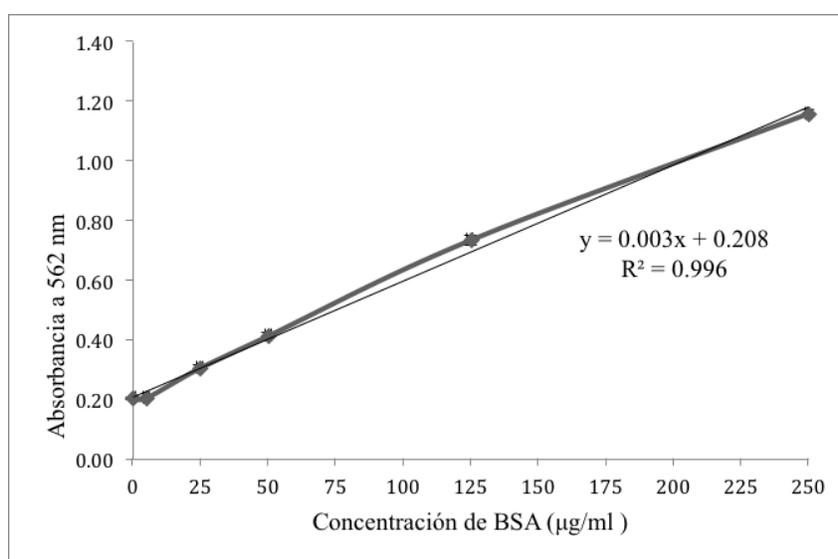


Figura 18. Curva de calibración de proteína obtenida con el método del BCA y utilizando albúmina de suero de bovino como estándar en un amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6.

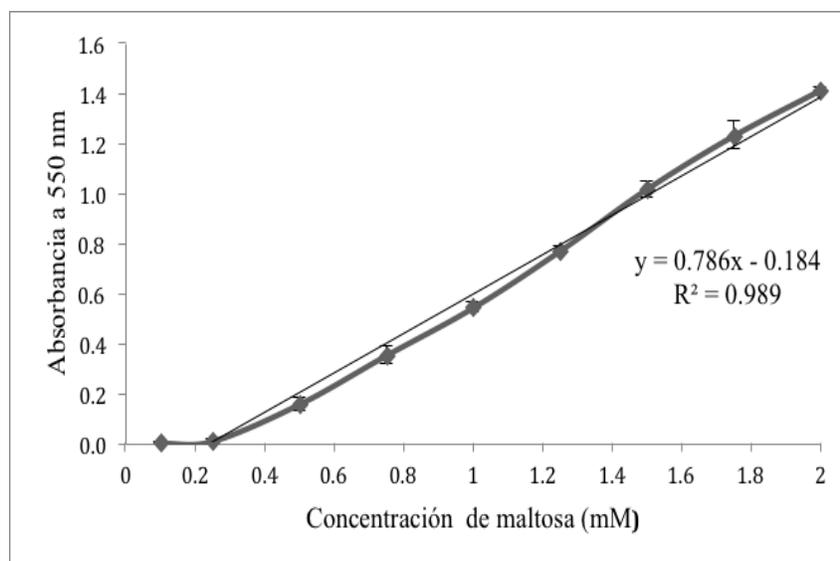


Figura 19. Curva estándar de maltosa para la cuantificación de azúcares reductores.

La proteína eluída del agar se aplicó a una columna de exclusión molecular Ultrogel ACA 202 que separa proteína en un intervalo de masa molecular de 1-22 kDa. En la Figura 20 se muestra el perfil de elución donde se pueden observar dos fracciones. A ambas fracciones se les midió la actividad amilolítica observando que la Fracción 1 era la más activa, con 40,135 U/mg mientras que la fracción 2 mostró una actividad de 10,220 U/mg, sin embargo, al verificar su masa por espectrometría de masas MALDI-TOF notamos que era la misma proteína con una masa de 6.4 kDa, lo que indicaba que esta se estaba oligomerizando y que los oligómeros de mayor tamaño eran más activos. Éste debe ser el mecanismo por el cuál la amilasa de *M. crenulata* presenta actividades tan altas, mayores a las reportadas para amilasas de otras fuentes ya que al oligomerizar exponen un mayor número de sitios catalíticos<sup>90-92</sup>. Este fue el primer indicio de que la proteína tendía a oligomerizar.

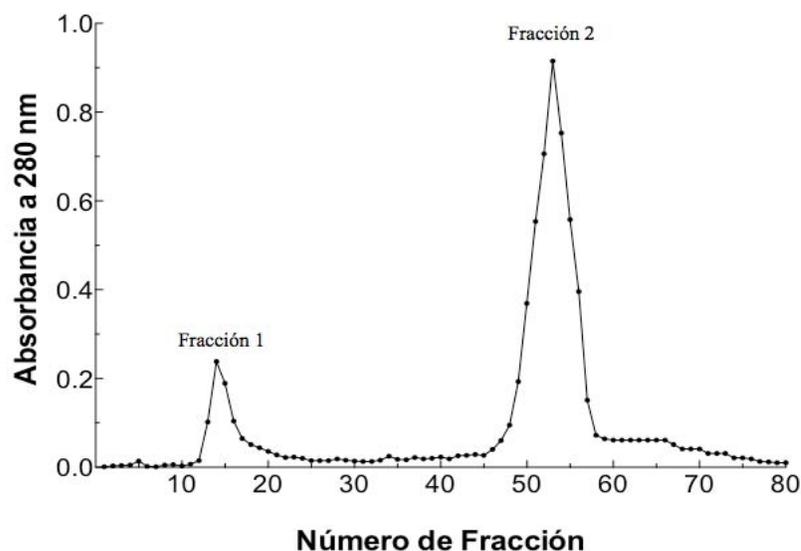


Figura 20. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó una resina de AcA 202 equilibrada con amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con 0.2 M de NaCl para evitar adsorción no específica.

## 6.2 Determinación de la masa molecular y pureza de la proteína

Para verificar que la proteína se encontraba pura, se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF donde observamos un solo pico con una masa de 6.4 kDa lo que demuestra la pureza de la proteína y además, que se trata de una de las amilasas más pequeñas reportadas a la fecha (Figura 21, Tabla 3). Incluso su masa está por debajo de las amilasas producidas por bacterias no formadoras de esporas, las que se considera que tienen las masas más pequeñas (aproximadamente 25 kDa). La  $\alpha$ -amilasa aislada de *Euphausia superba*, krill presente en los océanos Atlántico y Pacífico tiene una masa de 17 kDa, y es una de las amilasas más pequeñas reportadas a la fecha.

Tabla 3. Principales organismos productores de  $\alpha$ -amilasas

Fuente de la $\alpha$ -amilasa	Código PDB	Masa molecular (kDa)
Amilasa pancreática de cerdo (PPA)	1DHK	55.357
<i>Aspergillus oryzae</i> (TAKA)	6TAA	52.490
<i>B. subtilis</i> (BSUA)	1BAG	68.421

<i>B. amyloliquefaciens</i> (BAA)	1E43	58.843
<i>B. licheniformis</i> (BLA)	1BLI	58.274
<i>Euphausia superba</i>		17.0
<i>M. crenulata</i>		6.4 (presente estudio)

Es interesante señalar que para este ensayo se utilizaron dos matrices: el ácido sinapínico que es una matriz que se utiliza en general para proteínas con masa molecular arriba de 10 kDa, y el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico para masas menores a 10 kDa, sin embargo, no se obtuvieron resultados por lo que se probaron diferentes matrices, siendo la de DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y la súper DHB (mezcla de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con ácido 2-hidroxi-5 metoxibenzoico en una relación 9:1) con la que se obtuvo la mejor señal. Cabe señalar que estas matrices generalmente se utilizan cuando la proteína está glicosilada<sup>81</sup>, por lo que decidimos determinar si la amilasa de *M. crenulata* era una proteína con azúcares en su estructura.<sup>93</sup>

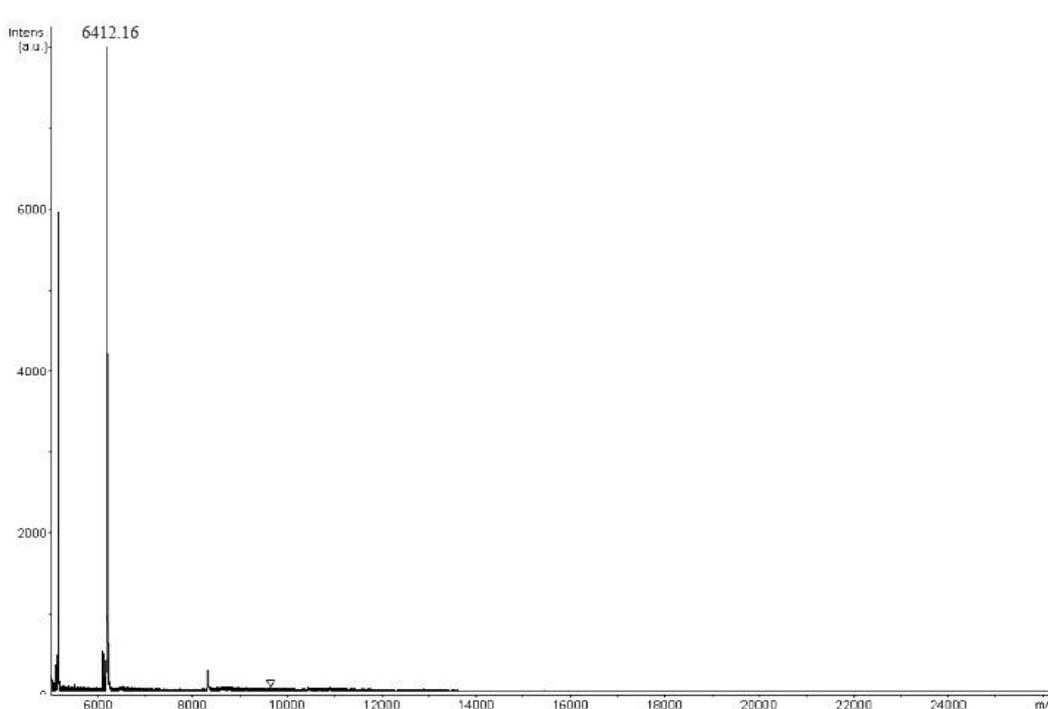


Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF. Se utilizó una matriz de Super DHB disuelta en una solución de acetonitrilo (30%), agua (70%) y TFA (0.1%)

### 6.3 Cuantificación de azúcares totales

Para determinar si la amilasa pura estaba glicosilada utilizamos el método del fenol-sulfúrico<sup>94</sup> y la curva de calibración que se muestra en la Figura 22. Este análisis nos indicó que se trataba de una glicoproteína que poseía 5.4% de azúcares en su estructura.

Es importante señalar que en muchas proteínas glicosiladas, mientras más alto es el grado de glicosilación es mayor su tendencia a oligomerizar debido a que se establecen interacciones azúcar-proteína ó azúcar-azúcar entre los monómeros de proteína, induciendo la oligomerización de la misma. Este mecanismo se ha observado en proteínas extremófilas ya que al oligomerizar protegen zonas lábiles de la proteína haciéndolas más estables.<sup>95-100</sup>

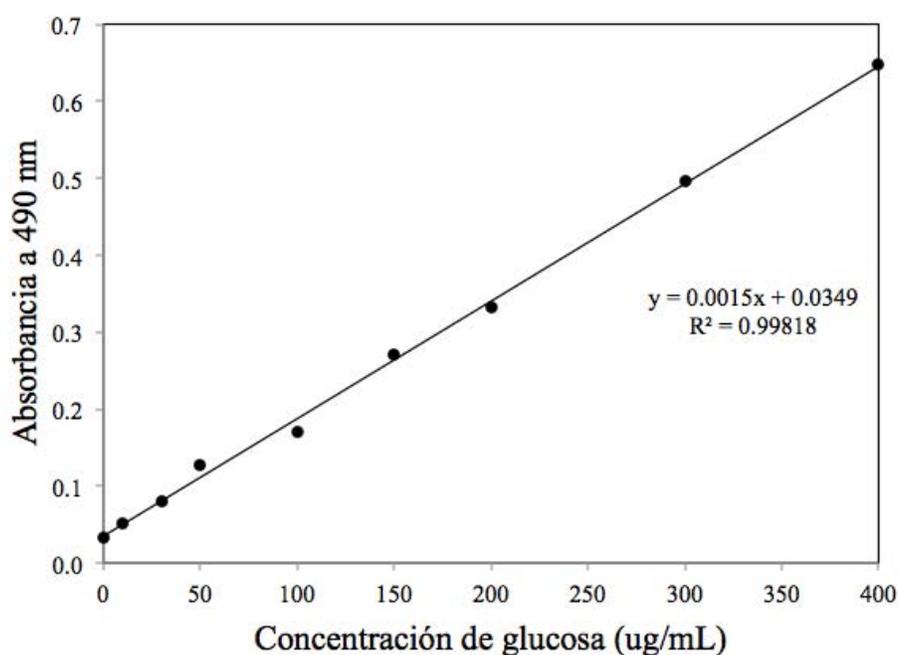


Figura 22. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico. Se utilizó glucosa como estándar.

#### 6.4 Parámetros óptimos de temperatura y pH para la actividad de la amilasa de *M. crenulata*

Se evaluaron los óptimos de actividad contra pH y temperatura mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS (ver métodos). Se observó que los valores óptimos para la actividad de la amilasa son a 30 °C y a pH de 6 (Figura 23). La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas tienen un pH óptimo en un intervalo de 6-7 y los óptimos de temperatura se han reportado en un intervalo entre 30-45 °C.<sup>101</sup> La  $\alpha$ -amilasa aislada de *Euphausia superba*, krill presente en los océanos Atlántico y Pacífico tiene un pH y temperatura óptimos de 6.4 y 35°C respectivamente,<sup>13</sup> que son muy parecidos a los óptimos de la  $\alpha$ -amilasa de *Megathura crenulata* reportados en este trabajo.

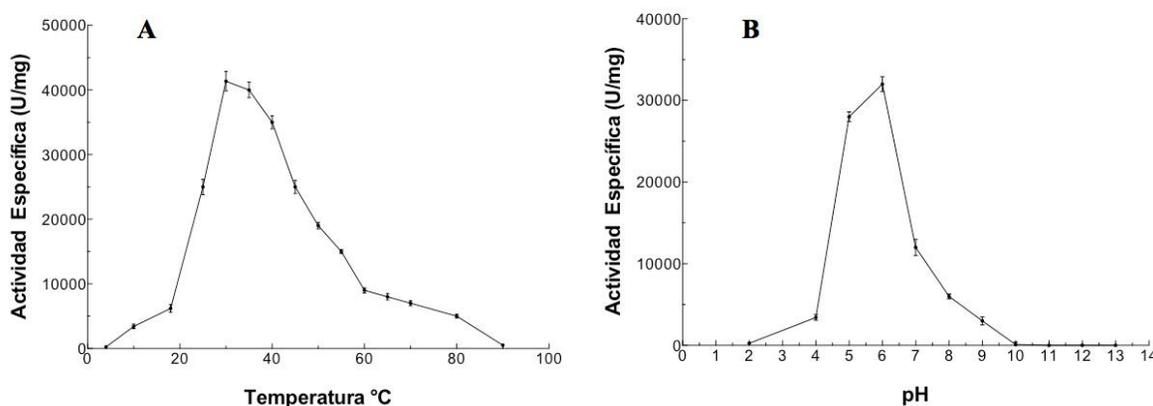


Figura 23. Óptimos de actividad de la amilasa de *M. crenulata* (A) Efecto de la temperatura 37°C (B) Efecto del pH 6.0

#### 6.5 Determinación de la especificidad

Con el fin de determinar la especificidad de la amilasa purificada se probaron diferentes sustratos sintéticos específicos para cada familia de amilasas. Se observó que la amilasa reconocía preferentemente el 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Maltósido lo que implica que lleva a cabo la hidrólisis como una  $\alpha$ -amilasa (E.C. 3.2.1.1), el resultado anterior es preliminar ya que sólo con sustratos sintéticos no podemos concluir que lleva a cabo una endo hidrólisis al azar de los enlaces  $\alpha$ -1,4 en polisacáridos como almidón, glucógeno y oligosacáridos. El anterior resultado concuerda con los estudios realizados por Martin, C., *et al.*<sup>77</sup> donde hace un análisis

de la presencia de enzimas hidrolíticas presentes en el tracto digestivo de *Megathura crenulata*. Este autor detecta la presencia de la actividad de  $\alpha$ -amilasa en el estilete cristalino que es una estructura transparente y gelatinosa compuesto de mucoproteínas y que es conocido por la secreción de enzimas digestivas como la  $\alpha$ -amilasa en los bivalvos. Sin embargo, esta amilasa también reconoció aunque en menor proporción el 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Glucopiranosido, lo que implica que también tiene actividad de  $\gamma$ -amilasa.

#### **6.6. Efecto de diferentes aditivos en la actividad de la amilasa de *M. crenulata***

Muchas sustancias modifican la actividad de una enzima, estos aditivos por lo regular se denominan activadores o inhibidores.<sup>102</sup> La mayoría de las amilasas conocidas son dependientes de iones metálicos.<sup>102-105</sup> Diferentes estudios muestran que la presencia de un ion metálico a altas concentraciones puede competir con otro metal presente a menor concentración y remplazarlo en el sitio de unión a metal, incluso cuando la afinidad sea menor.<sup>106</sup> Como se observa en la Figura 24 los iones  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  exhiben un marcado incremento en la actividad enzimática, siendo el  $\text{Ni}^{2+}$  el que mostró un mayor efecto aumentando más del 100% la actividad enzimática. Estos resultados son congruentes con lo obtenido en la caracterización de la amilasa del copépodo *Heliodiaptomus viduus* (organismo presente en el zooplancton acuático) en donde se observa un efecto similar con estos iones.<sup>107</sup> Los iones  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Li}^{+}$  mostraron un moderado incremento en la actividad enzimática de la amilasa de *M. crenulata*, el efecto del ion  $\text{Zn}^{2+}$  cambia mucho entre diferentes amilasas, en el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *Schwanniomyces alluvius* actúa como un potente inhibidor.<sup>108</sup> Se reporta el mismo efecto de estos iones sobre la actividad de la amilasa de soya.<sup>109</sup> Se han reportado diferentes amilasas que requieren el ion  $\text{Ca}^{2+}$  para ser estables y funcionales y que son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA,<sup>110,111</sup> sin embargo, la amilasa de *Megathura crenulata* no se inhibió con EDTA, al igual que la amilasa de soya, este resultado sugiere que no es una metaloenzima y es fuertemente resistente a la acción de agentes quelantes. Este resultado sugiere que puede tener una gran aplicación en la industria de detergentes, ya que los agentes quelantes como el EDTA son indispensables en las formulaciones de productos para esa industria.<sup>100</sup>

En presencia de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , se observó una inhibición total de la actividad de la enzima. Se ha reportado que los iones  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  tiene un potencial efecto inhibitorio

en la actividad de algunas amilasas de bacterias y hongos.<sup>112</sup> Se sabe que el grupo tiol de las cisteínas puede coordinar iones metálicos,<sup>113</sup> por lo que el efecto inhibitorio del ion  $\text{Hg}^{2+}$  sobre las amilasas nos puede indicar la existencia de una necesaria para la catálisis o bien que sea estructural favoreciendo la estabilidad de la misma. Se ha observado que en proteínas que poseen en su sitio catalítico grupos tiol o sulfidrilos libres, estos interactúan con el mercurio formando mercaptidos impidiendo que funcione el sitio catalítico de la enzima. El ion  $\text{Cu}^{2+}$  inhibe completamente la amilasa de *Bacillus subtilis* JS-2004.<sup>114</sup>

Mediante la adición de polioles como Sorbitol y Manitol, y polímeros como el PEG-400 y PEG-Citrato se observó un incremento en la actividad enzimática, siendo el caso del Manitol y PEG-400 los que tuvieron un efecto mayor. Se ha establecido que el PEG interactúa con las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas, favoreciendo un plegamiento estable que le confiere una mayor actividad a la enzima.<sup>115,116</sup> Este resultado concuerda con la evaluación de la activación, inhibición y estabilización de 10 amilasas de la familia de  $\alpha$ -amilasas [Porcine Pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA), Human Salivary  $\alpha$ -amylase (HSA), *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase (AOA), *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase (BAA), *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA),  $\beta$ -amylase ( $\beta$ -A), *Aspergillus niger* glucoamylase (GA), *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase (PUL) y *Bacillus macerans* Cyclomaltodextrin glucanyltransferase (CGTase)]<sup>117</sup> en donde se observó que todas las amilasas presentan una activación en presencia de PEG, desde PEG-400 hasta PEG-8000. La activación de las enzimas muestra diferente especificidad para los distintos grados de polimerización del PEG, lo que depende completamente del tipo de amilasa y la reacción estereoquímica que llevan a cabo durante la hidrólisis de su sustrato específico. Para el caso de los polioles, su uso es muy común en formulaciones enzimáticas ya que ayuda a que no haya pérdida de actividad y evita la agregación de las proteínas, principalmente por interacciones solvofóbicas.<sup>117</sup>

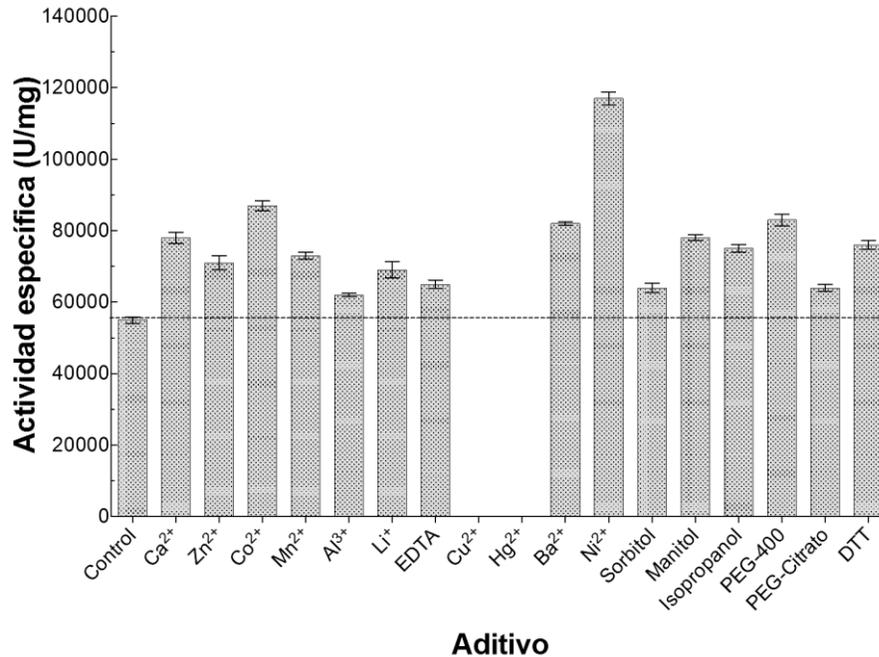


Figura 24. Efecto de diferentes aditivos en la actividad de la amilasa de *M. crenulata*

### 6.7 Estabilidad de la amilasa de *M. crenulata*

La caracterización de proteínas puras en muchas ocasiones constituye un reto difícil de vencer, esto debido a que una vez que se extraen de la célula, son aisladas del medio que las mantiene estables por lo que muestran pérdida de estabilidad y actividad en los amortiguadores generalmente utilizados. Es por esto que es necesario encontrar las condiciones necesarias para recuperar la integridad y actividad de las proteínas. Muchas veces estas condiciones pueden ser inferidas dependiendo de la naturaleza de la proteína, pero en muchos casos estas son desconocidas. Por lo anterior, es necesario probar una gama de condiciones como pH, tipo de amortiguador, fuerza iónica, aditivos, etc.

A la fecha, no es suficiente con tener a las proteínas puras y activas, sino que además es necesario tenerlas en estado monodisperso y estable para lograr un análisis más preciso de sus características. Los estudios estructurales son particularmente demandantes porque las proteínas deben mantenerse estables en condiciones un tanto extremas, por ejemplo, para cristalizarlas se requieren altas concentraciones y mantenerlas a 18 °C hasta que cristalicen y muchas proteínas no son estables en estas condiciones. Por esto es de vital importancia

determinar la estabilidad de las proteínas bajo diferentes condiciones, para esto se pueden utilizar diferentes técnicas como son el dicróismo circular acoplado a un gradiente de temperatura que puede utilizarse para seguir la pérdida de estructura secundaria como una señal de desplegamiento a elevadas temperaturas; con dispersión dinámica de luz podemos ver la agregación al aplicar un gradiente de temperatura, o por calorimetría diferencial de barrido, sin embargo en todos los casos se requiere mucho tiempo y grandes cantidades de proteína para probar diferentes condiciones. La termofluorescencia ha demostrado ser una técnica útil para evaluar la estabilidad térmica de una manera sistemática y que permite ensayar simultáneamente una gran cantidad de condiciones con cantidades relativamente pequeñas de muestra.

La amilasa de *M. crenulata* muestra una fuerte tendencia a la oligomerización, esta característica dificulta su concentración, debido a lo anterior es muy probable que se encuentre en forma polidispersa y se vea favorecida una precipitación, lo que impide obtener cristales adecuados para posteriores estudios de difracción de rayos X. Es por esto que se decidió evaluar la estabilidad de la proteína bajo diferentes condiciones. Se utilizaron 3 kits utilizados frecuentemente en estudios de cristalización. Primero se observó el efecto del pH y de las sales amortiguadoras.

#### **6.7.1 Efecto del pH y sales amortiguadoras**

Fue interesante notar que el control mostró una  $T_m$  de 70 °C lo que la clasifica como una proteína de termoestabilidad media, en comparación con otras enzimas homólogas (Tabla 4) de termoestabilidad alta como las producidas por *Bacillus licheniformis* y *Pyrococcus furiosus*. Esto implica que en las condiciones en que estamos trabajando a la proteína esta es muy estable, sin embargo muchas proteínas logran su estabilidad mediante mecanismos de oligomerización que les permiten proteger zonas lábiles, lo que puede implicar que es este el mecanismo por el cual logra su estabilidad y por esto no podemos concentrar. De las 96 condiciones en 4 de ellas se observaron resultados interesantes. Se observó que la proteína es muy sensible al pH (Figura 25), cuando este se incrementa, la proteína pierde estabilidad lo que se refleja en una  $T_m$  más baja. El mismo efecto se observó a pH ácidos, siendo el óptimo a pH 6 que es como la habíamos estado trabajando (control).

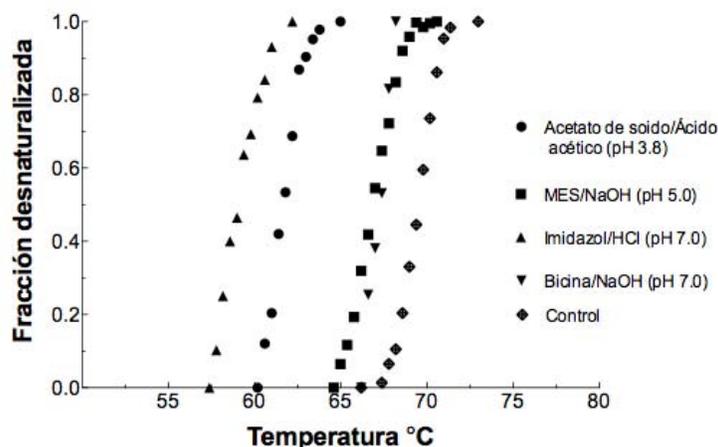


Figura 25. Efecto del pH y de sales amortiguadoras en la estabilidad de la lectina de *M. crenulata*.

Tabla 4.  $\alpha$ -amilasas de las que se conoce su estructura terciaria y sus propiedades de estabilidad térmica

Origen	Código PDB	No. de residuos	Peso molecular (kDa)	No. de iones $\text{Ca}^{2+}$	Otros iones	No. de puentes disulfuro (No. Cys)	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
<i>Alteromonas haloplanctis</i> (AHA) psicrófila	1AQH	453	49.358	1	1 $\text{Cl}^-$	4(8)	44
Pig pancreatic (PPA) mesófila	1DHK	496	55.357	1	1 $\text{Cl}^-$	4(12)	65
<i>Aspergillus oryzae</i> (TAKA) mesófila	6TAA	478	52.490	2	-	4(9)	71
<i>Bacillus subtilis</i> (BSUA) mesófila	1BAG	619	68.421	3	-	0(1)	83
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BAA) termófila-mesófila	1E43	483	58.843	4	1 Na	0	86
<i>Bacillus licheniformis</i> (BLA) termófila-mesófila	1BLI	483	58.274	3	1 Na	0	102
<i>Pyrococcus woesi/furiosus</i> (PWA)/(PFA) hipertermófila	1MXG	435	50.175	1	$\text{Zn}$ , 3 $\text{Mg}$	2(5)	~110

### 6.7.2. Efecto de diferentes iones en la estabilidad de *M. crenulata*

Se evaluó el efecto de diferentes iones en la estabilidad de la proteína pura. Se probaron las 96 condiciones del kit de iones de Hampton Research, observando que 6 condiciones favorecían la estabilidad de la proteína pero de diferente manera (Figura 26). Es interesante notar que iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el praseodimio favorecieron su estabilidad. Ya antes habíamos mencionado que el  $\text{Ca}^{2+}$  era necesario para la actividad de diversas amilasas (Tabla 5) y observamos que para la amilasa purificada también favorece su estabilidad. La afinidad de las amilasas por iones divalentes varía considerablemente dependiendo de la fuente de la enzima, estudios realizados con la  $\alpha$ -amilasa de BAA<sup>117</sup> revelaron que tiene 17 posibles sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y 25 a  $\text{Co}^{2+}$ . La actividad de esta enzima se vio favorecida al aumentar la concentración de iones  $\text{Co}^{2+}$ , sin embargo, la temperatura de desnaturalización disminuye, por lo tanto, se cree que los iones divalentes actúan en conjunto, uno como estabilizador y el otro como activador, para el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *Megathura crenulata* el ion  $\text{Ca}^{2+}$  parece favorecer la estabilidad térmica de la enzima mientras que el  $\text{Co}^{2+}$  actúa como un activador, incrementando considerablemente su actividad amilolítica.

El ion que favoreció más la actividad fue el praseodimio, llevando la  $T_m$  a un valor de 74.5°C. Dicho ion pesado se utiliza comúnmente para derivatizar a las proteínas y determinar su estructura terciaria por técnicas como MAD, SAD, o reemplazo isomórfico. Básicamente se une a la proteína coordinándose con aminoácidos ácidos e incrementando la capa de solvatación y en muchas ocasiones estabilizando asas muy móviles que al mantenerse más rígidas se evita la agregación de las proteínas. Es interesante notar que la galactosa estabiliza también a la amilasa, esto explica porque cuando se purifica con agar (que está formado por agarosa y agarpectina y ambos constituidos por galactosas) la proteína se mantiene estable, algo que antes no se había logrado ya que la proteína se desestabilizaba en cuanto se iniciaba la purificación por las técnicas convencionales (intercambio iónico o exclusión molecular), perdiéndose la actividad en cuestión de horas y precipitando, sin lograr llegar a la purificación total antes de que esto ocurriera. Por otro lado, el efecto estabilizante del polipropileno glicol y del dioxano nos habla de la naturaleza hidrofóbica de la proteína. Estos aditivos favorecen las interacciones no polares.<sup>118</sup>

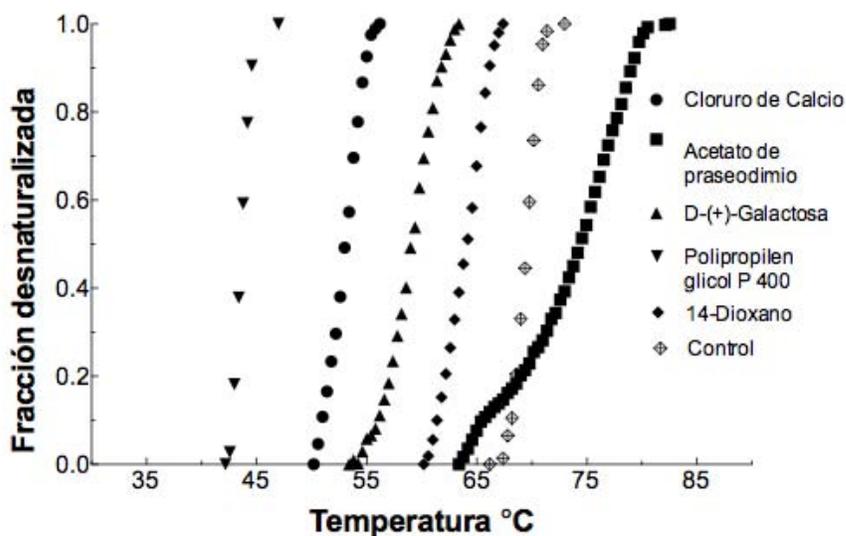


Figura 26. Efecto de diferentes iones en la estabilidad térmica de la amilasa de *M. crenulata*.

Tabla 5. En esta tabla se observa el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la estabilidad térmica en  $\alpha$ -amilasas con aplicación industrial. Las abreviaturas son las mismas de la Tabla 4.

Enzimas	$T_m$ (°C) saturada con $\text{Ca}^{2+}$	$T_m$ (°C) Sin $\text{Ca}^{2+}$	$\Delta T_m$ (°C)
AHA	44	44	0
PPA	65	48	17
TAKA	71	57	14
BSUA	83	46	37
BAA	86	38	48
BLA	102	52	50
PWA/PFA	~110	n.d.	n.d.

### 6.7.3. Efecto de diferentes agentes solubilizantes en la estabilidad de la amilasa pura

Finalmente en los resultados obtenidos con las 96 soluciones del kit de solubilidad y estabilidad, se observó que cuatro de ellas favorecieron su estabilidad (Figura 27). Observamos que los aditivos que aumentaron la estabilidad térmica de la amilasa fueron la Espermidina (+20.4 °C) y el Glutati3n reducido (+21.5°C). En estudios anteriores se ha observado el efecto protector del GSH en este tipo de enzimas, por ejemplo contra

compuestos como aldehídos saturados e insaturados presentes en el humo de cigarro, los cuales modifican estructuras biológicas actuando como agentes oxidantes, pro-inflamatorios y carcinógenos, estos compuestos tienen una actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -amilasa presente en la saliva humana, se ha observado que el GSH (1mM) tiene un efecto protector sobre la actividad enzimática, lo que puede sugerir que el GSH ofrece protección contra la oxidación, en especial de algunos grupos -SH de la enzima, los cuales, probablemente se encuentren en el sitio activo, una posible explicación para el caso de la oxidación con aldehídos es que el GSH actúa como donador de grupos tioles, en lugar de las cisteínas presentes en la enzima. Se cree que los puentes disulfuro estabilizan la mayoría de las proteínas a través de un efecto entrópico, por la disminución de la entropía de estado desplegado de la proteína. Este efecto entrópico de los puentes disulfuro se incrementa en proporción al logaritmo del número de residuos que separan las dos cisteínas en cada puente. Para el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *Megathura crenulata*, al haber un aumento en la actividad enzimática y un aumento en la estabilidad térmica, nos indican dos cosas, que hay cisteínas importantes cerca del sitio activo y que hay cisteínas estructurales. Por lo regular, las enzimas homólogas tienen de 1 a 8 cisteínas en su secuencia de aminoácidos, sin una relación aparente entre el número de cisteínas y su estabilidad térmica, de hecho, las  $\alpha$ -amilasas de BLA y BAA no tienen residuos de cisteína y tienen una  $T_m$  de 106°C y 82°C respectivamente (la estabilidad térmica de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* se debe principalmente a puentes salinos adicionales con residuos específicos de lisina), mientras que la amilasa de BAA tiene un solo residuo en su estructura, en el caso de la  $\alpha$ -amilasa de PWA, cuatro de los cinco residuos de cisteína están implicados en puentes disulfuro, uno de ellos muy cerca del sitio de unión a metales, la única cisteína (C166) que no está involucrada en la formación de puentes disulfuro ayuda a la coordinación en el sitio de unión a metal ( $Zn^{2+}$ ). Para poder evaluar la relación que tiene la presencia de cisteínas con la termoestabilidad, en la misma  $\alpha$ -amilasa de PWA se hicieron estudios de mutagénesis dirigida y se sustituyó la cisteína 166 por serina, lo cual, condujo a la pérdida de la termoestabilidad. Lo que indirectamente sugiere que el papel de los iones metálicos es muy importante en la termoestabilidad (ver más abajo). Por otra parte, se esperaría que al tener un mayor número de residuos de cisteína y por ende, mayor número de puentes disulfuro la termoestabilidad fuera mayor, siendo que no es así, para el caso de la  $\alpha$ -amilasa de AHA tiene 8 residuos de cisteína y 4 puentes, la de PPA tiene doce residuos de

cisteína y 4 puentes disulfuro, pero su comportamiento térmico no es estable a altas temperaturas. Por lo que se puede concluir que el número de puentes disulfuro no es directamente proporcional a la estabilidad térmica, pero la presencia de cisteínas libres para unirse a iones metálicos, podría estar relacionado a una mayor estabilidad térmica. Por otro lado, la espermidina incrementó la  $T_m$  20.4 °C, esta poliamina presente en casi todos los organismos vivos, aumenta en gran medida la solubilidad de muchas enzimas evitando la agregación.<sup>109</sup>

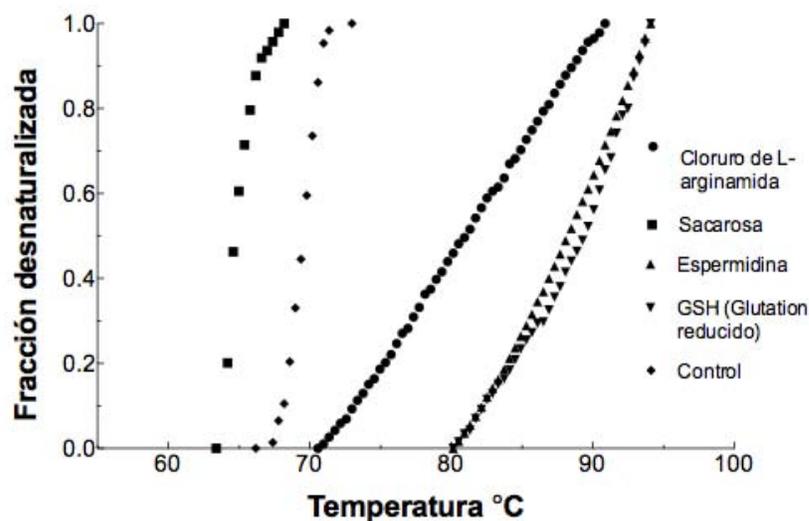


Figura 27. Efecto de agentes solubilizantes en la estabilidad de la amilasa de *M. crenulata*

## 6.8 Estudios de dicroísmo circular en el UV lejano

Con el fin de analizar el contenido de estructura secundaria de la amilasa pura se corrió un espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano. El espectro obtenido corresponde a una proteína intrínsecamente desestructurada (PID) (Figura 28 A). Estas proteínas existen y funcionan aún sin una estructura terciaria bien definida, lo que desafía el paradigma clásico de la estructura-función que establece que una proteína no es funcional hasta que adquiere su estructura terciaria<sup>119-122</sup>. Las PID pueden llevar a cabo funciones esenciales que incluyen la regulación de la transcripción y la traducción, la transducción de la señal celular, fosforilación de proteínas, el almacenamiento de pequeñas moléculas, como chaperonas y la regulación del auto-ensamblaje de grandes complejos multiprotéicos tales como el flagelo bacteriano y el ribosoma. Las proteínas intrínsecamente desordenadas generalmente

funcionan por reconocimiento molecular en donde motivos pequeños o segmentos desordenados son los que se utilizan en el reconocimiento de un determinado ligando induciéndose la formación de estructuras ordenadas aunque en muchas ocasiones las estructuras desordenadas se mantienen o se ordenan muy poco.<sup>123-126</sup> Se ha observado que este tipo de proteínas debido a su gran flexibilidad estructural, pueden reconocer diferentes ligandos resultando en proteínas que pueden realizar diferentes funciones (proteínas promiscuas).<sup>127</sup>

## 6.9 Actividad de Lectina

Un aspecto interesante de resaltar fue el método como se purificó a la amilasa, es decir por medio de su interacción con el agar. Este comportamiento nos sugirió que podría tener una función de lectina por lo que decidimos probar dicha actividad dando positivo y además mostrando una actividad específica muy alta. Para determinar su especificidad como lectina se probaron 55 azúcares mono y oligosacáridos, observando que reconocía a la galactosa con una concentración mínima inhibitoria de 2 mM, lo que implica que es muy afín a ella. Esto explica el porqué de que se haya unido al agar. Uno de los papeles más probables de lectinas de invertebrados marinos es la de actuar como factores humorales en el mecanismo de defensa, al igual que las inmunoglobulinas en los vertebrados. Estas lectinas pueden desempeñar un papel importante contra las infecciones bacterianas o enemigos naturales. Una lectina con actividades biológicas tales como actividades mitogénicas y quimiotácticas se ha encontrado en el veneno de la pedicelarios (espinas) de *Toxopneustes pileolus* (erizo de mar), lo que sugiere su implicación en la acción tóxica. Otras funciones de las lectinas de invertebrados marinos de tipo C son las siguientes: cristalización de carbonato de calcio (la bellota de mar, *Megabalanus rosa*), la morfogénesis (tunicado, *Polyandrocarpa misakiensis*), y la lisis capa vitelina (el mejillón azul, *Mytilus edulis*). Estas sugieren que puede haber varias lectinas con diferentes papeles fisiológicos.

Fue muy interesante notar que la amilasa tenía actividad de lectina, que aglutinaba eritrocitos de conejo formalinizados y que tenía especificidad por galactosidos, compuesto que además se vió que favorecía su estabilidad térmica. Por lo anterior decidimos probar el efecto de este azúcar en la conformación de la amilasa y observamos que en presencia de galactosa la proteína se estructura (Figura 28 B y Tabla 6)

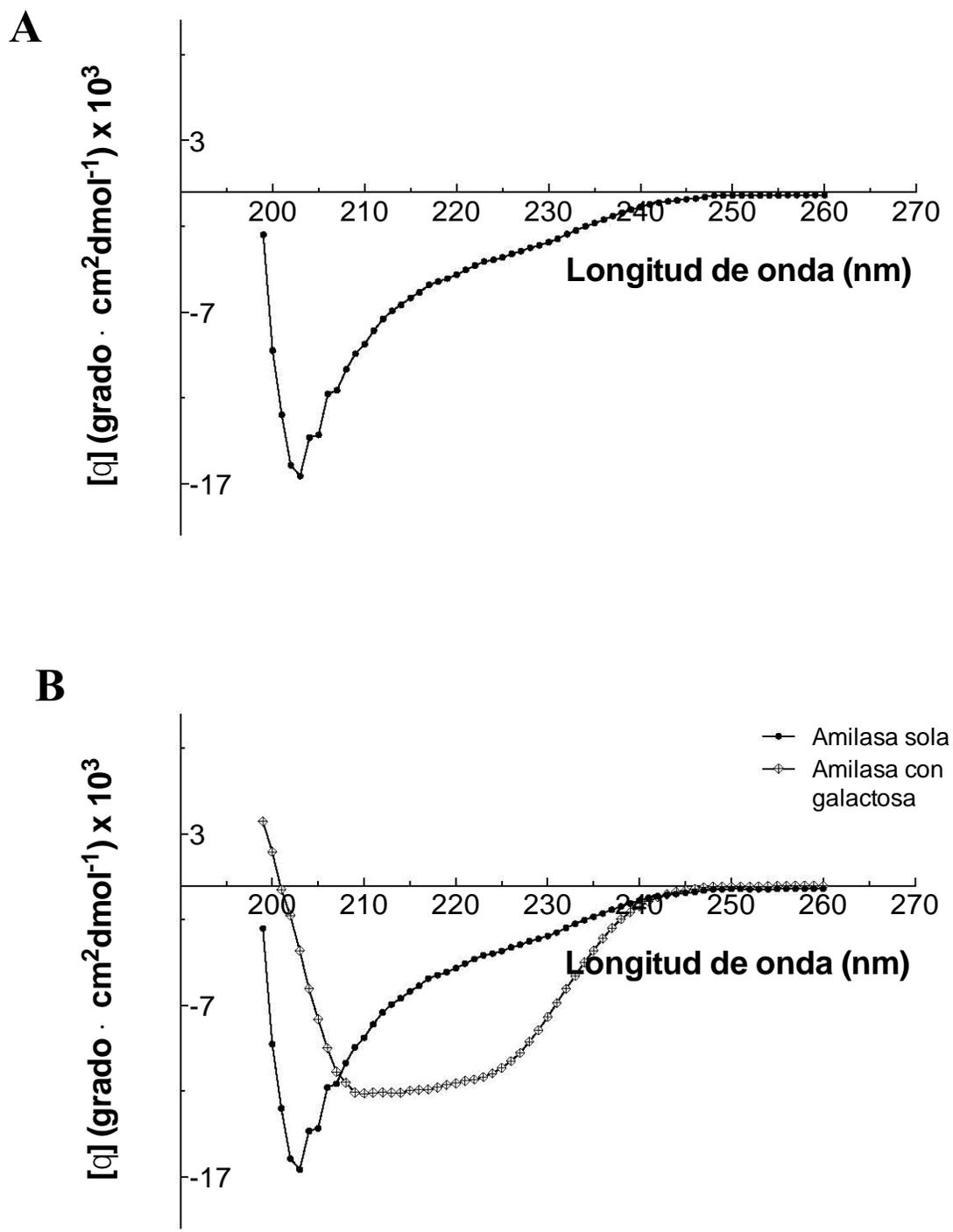


Figura 28. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la amilasa de *M. crenulata* A) Proteína en amortiguador de acetatos 10 mM pH 6 B) proteína en presencia de 5 mM de galactosa

Tabla 6. Contenido de estructura secundaria de la amilasa de *M. crenulata* en presencia de galactosa

Hélices (%)	Láminas (%)	Giros (%)	Desestructurada (%)
44	18	17	21

## 7.0 CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró la purificación de una amilasa del tracto digestivo del molusco marino *Megathura crenulata*. Lo anterior se logró con un método sencillo y económico que permite mantener a la proteína activa y estable.

La proteína mostró una masa molecular de 6.4 kDa lo que la ubica como la amilasa más pequeña reportada a la fecha. Mediante pruebas de especificidad con sustratos sintéticos, se sabe que puede tener actividad de  $\alpha$ -amilasa. La enzima mostró una fuerte tendencia a oligomerizar, este comportamiento puede estar favorecido por la presencia de 5.4 % de glicosilación.

La actividad de la amilasa mostró un óptimo a pH 6 y 35 °C y fue inhibida por completo en presencia de mercurio y cobre mientras que el níquel, calcio y el cobalto la aumentaron.

La amilasa de *M. crenulata* es termoestable con una  $T_m$  de 70 °C, su estabilidad se vió incrementada en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 y en presencia de acetato de praseodimio, calcio, galactosa, espermidina y glutatión reducido.

Los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano demostraron que se trata de una proteína intrínsecamente desestructurada y que en presencia de galactosa adquiere estructura donde predominan las hélices.

Tiene actividad de lectina y su especificidad es por galactósidos, debido a esto se pudo purificar uniéndolo al agar y se estabiliza en presencia de su ligando (galactosa).

## 8.0 REFERENCIAS

1. Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998) Mini review: Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol.* 23, 85-112.
2. Banks W, Greenwood CT. (1975) Starch and its Components. *Starch* 27, 325
3. Takeda Y, Hizukuri S, Takeda C, Suzuki A. (1987) Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydr. Res.* 165, 139-145.
4. Hizukuri S, Takeda Y, Abe J, Hanashiro I, Matsunobu G, Kiyota H. (1997) In: Frazier PJ, Richmond P, Donald AM, editors. *Starch: Structure and Functionality*. London: Royal Society of Chemistry, vol. 121.
5. Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X. (2004) Starch- composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* 39, 151-165
6. Tomasik, P., Horton, D., (2012) Enzymatic conversion of starch. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 68, 59-436.
7. Aspinall, G.O. (1982) General Introduction. En: *The Polysaccharides*. Vol 1, Ed. Academic Press, 1-18.
8. Wild, G.M. (1954) Action patterns of starch enzymes, *Retrospective Theses and Dissertations*, Iowa State University.
9. Kitano, T. (1937) Taka amylase XV. Selective adsorption of taka diastase solutions purified by adsorption. *J. Soc. Chem. Ind. Jpn.* 40, 38-41.
10. Kitano, T. (1937) Taka amylase XVI. Purification of taka amylose by adsorption. *J. Soc. Chem. Ind. Jpn.* 40, 41-43.
11. Vihinen, M. and Manstala, P. (1989) Microbial amyolytic enzyme, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 329-418.
12. Hill, G.A., Macdonald, D.G. and Lang, X. (1997) Amylase inhibition and inactivation in barley malt using cold starch hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 19, 1139-1141.
13. Perry, G.H., Dominy, N.J., Clow, K.G., Lee, A.S., Fiegler, H., Redon, R., Werner, J., Villanea, F.A., Mountain, J.L., Misra, R., Carter, N.P., Lee, C. and Stone, A.C. (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* 39, 1256-1260.

14. Hsu, P.H. (1981) Purification and properties of  $\alpha$ -amylases from *Euphausia superba*. Chung-kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih, 19, 74-85. Chem. Abstr. 95 216880w.
15. Mitsui, T., Yamaguchi, J. and Akasawa, T. (1996) Physicochemical and serological characterization of rice alpha amylase isoforms and identification of new corresponding gene. Plant Physiol. 110, 1395-1404.
16. Beleia, A. and Varriano-Marston, E. (1981) Pearl millet amylases. II. Activity toward intact and heated starch granules. Cereal Chem. 58, 437-440.
17. DeHaas, B.W., Chapman, D.W., and Goering, K.J. (1978) An investigation of the alpha-amylase from selfliquefying barley starch. Cereal Chem. 55, 127-137.
18. Goering, K.J. and Eslick, R. (1978) Waxy barley starch with unique self liquefying properties. US Patent, 4,116,770. Chem. Abstr., 90, 20833k.
19. Kotaka, T. and Sasaibe, M. (1968) Heat stability of bacterial amylase in the enzymic liquefaction process of heavy starch slurries. Dempun Kogyo Gakkaishi, 16, 92-95.
20. Smith, I.A. (1970) Factors affecting enzymic starch hydrolysis in sugar solutions. Sugar News, 46, 454-458.
21. Madsen, G.B., Norman, B.E. and Slott, S. (1973) A new heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. Starch/Starke, 25, 304-308.
22. Chiang, J.P., Alter, J.E. and Sternberg, M. (1979) Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, Starch/Starke, 31, 86-92.
23. Yankov, D., Dobрева, E., Beshkov, V. and Emanuilova, E. (1986) Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable  $\alpha$ -amylase. Enzyme Microb. Technol. 8, 665-667.
24. Takasaki, Y., Furutani, S., Hayashi, S. and Imada, K. (1994) Acid-stable and thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Ferm. Bioeng. 77, 94-96.
25. Das, K., Doley, R., Mukherjee, A.K. (2004) Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. Biotechnol. Appl. Biochem. 40 (2004) 291-298.
26. Okada, S. and Kitahata, S. (1983) Hydrolysis of  $\alpha$ -1,6-glucosidic bond by *Streptococcus bovis*  $\alpha$ -amylase. Denpun Kagaku, 30, 199.

27. Kwak, Y.S., Akiba, T. and Kudo, T. (1998) Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 glucosidic linkages. *J. Ferm. Bioeng.* 86, 363-367.
28. Bhat, J.V. and Mahomed, N. (1950) Amylolytic activity of certain genera of molds. *J. Univ. Bombay*, 18B, *Sci.* 27, 1-2.
29. Hang, M.T., Furuyoshi, S., Yagi, T. and Yamamoto, S. (1996) Purification and characterization of raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. *Oyo Toshitsu Kagaku*, 43, 487-497.
30. Starka, J. (1955) Dynamics of starch hydrolysis by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* amylases. *Preslia* 27, 154-169.
31. Miyoshi, S., Higashihara, M. and Okada, S. (1986) Action of bacterial  $\beta$ -amylase on raw starch. *Denpun Kagaku*, 33, 238-243.
32. Higashihara, M., Miyoshi, S. and Okada, S. (1987) Action of  $\beta$ -amylase on raw starch. *Denpun Kagaku*, 34, 106-112.
33. Higashihara, T., Maruo, and Hatanaka, Y. (1992) Studies on retrogradation of raw corn starch treated with bacterial  $\beta$ -amylase. *Kagaku to Kogyo*, 66, 101-105.
34. Baker, J. (1983) Properties of amylases from midguts of larvae *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochem.* 13, 421-428.
35. Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. and Mikami, R. (2000) Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules. *Process Biochem.* 35, 711-715.
36. Outtrup, H. and Norman, B.E. (1984) Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant-DNA techniques, *Starch/Starke*, 36, 405-411.
37. Ray, R.R. and Chakraverty, R. (1998) Extracellular  $\beta$ -amylase from *Syncephalastrum racemosum*. *Mycol. Res.* 102, 1563-1567.
38. Masuda, H., Murata, M., Takahashi, T. and Sugawara, S. (1998) Purification and properties of glucoamylase from sugar beet cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 88, 172-177.
39. Hizukuri, S. (1987) Raw starch digesting activity and kinetic properties of glucoamylases. *Denpun Kagaku* 34, 98-105.

40. Sills, A.M., Sauder, M.E. and Stewart, G.G. (1983) Amylase activity in certain yeasts and a fungal species. *Dev. Ind. Microbiol.* 24, 295-303.
41. Wijbeng, D.J., Beldman, G., Veen, A. and Binnema, D.J. (1991) Production of native starch degrading enzymes by a *Bacillus lentus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 180-184.
42. Ilori, M.O., Amund, O.O. and Omidjii, O. (1996) Effect of carbon and nitrogen sources on glucoamylase production in *Lactobacillus brevis*. *Folia Microbiol.* 41, 339-340.
43. Taylor, P.M., Napier, E.J. and Fleming, L.D. (1978) Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola humuginosa*. *Carbohydr. Res.* 61, 301-308.
44. Dalmia, B.K. and Nikolov, Z.L. (1991) Characterization of glucoamylase adsorption to raw starch, *Enzyme Microb. Technol.* 13, 982-990.
45. Nakai, H., Ito, T., Tanizawa, S., Matsubara, K., Yamamoto, T., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Sano, Y. and Kimura, A. (2006) Plant  $\alpha$ -glucosidase: Molecular analysis of rice  $\alpha$ -glucosidase and degradation mechanism of starch granules in germination stage. *J. Appl. Glycosci.* 53, 137-142.
46. Stenholm, K., Home, S., Lauro, M., Perttula, M. and Suortti, T. (1997) Hydrolysis of barley starch by malt limit dextrinase. *Proc. 26th. Eur. Brewery Conv.* 283-290. *Chem. Abstr.*, 129 (1998) 548859.
47. Lappalainen, A., Niku-Paavola, M.L., Suortti, T. and Poutanen, K. (1991) Purification and characterization of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enzymatic starch modification. *Starch/Starke*, 43, 477-482.
48. Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Imanaka, T. and Okada, S. (1993) Highly branched oligosaccharide produced by the transglycosylation reaction of neopullulanase. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 184-190.
49. Nakagawa R. and Kobayashi, S. (1992) Analysis of degradation products from amylose, amylopectin and starch by isoamylase. *Hokkaidoritsu Kogyo Shikenjo Hokoku*, 289, 79-88. *Chem. Abstr.* 117, 65400.
50. Nielsen, H.K. (1991) Novel bacteriolytic enzymes and cyclodextrin glycosyl transferases for the food industry, *Food Technol.* 45, 102-104.

51. Henrissat B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
52. Henrissat B y Bairoch A (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
53. Henrissat, B. y Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316, 695-696.
54. Davies, G. y Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3, 853-859.
55. Henrissat, B. y Davies, G.J. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 637-644.
56. Coutinho, P.M. y Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering.* pp. 3-12. Editado por H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, England.
57. Grzeskowiak, M., Kaczmarek, R. and Remiszewski, M. (1974) Effect of different factors on the degree of saccharification and the sugar composition in starch hydrolysates produced using a fungal amylolytic preparation, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 159, 265-273.
58. Carroll, J.O., Swanson, T.R. and Trackman, P.C. (1990) Starch liquefaction with alpha amylase mixtures, US Patent 4933279. *Chem. Abstr.* 114, 60471.
59. Patil, V.B. and Patil, N.B. (2000) Biomass conversion: Synergistic use of immobilized  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase for rapid and maximum conversion of starch into glucose, *Indian J. Chem. Technol.* 7, 47-50.
60. Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T., Sakano, Y. (1999) Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -amylase II (TVAIL) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 287, 907-921.
61. Feese, M D., Kato, Y., Tamada, T., Kato, M., Komeda, T., Miura, Y., Hirose, M., Hondo, K., Kobayashi, K., Kuroki, R. (2000) Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* 301, 451-464.
62. Friedberg, F. (1983) On the primary structure of amylases. *FEBS Lett.* 152, 139-140.

63. Nakajima, R., Imanaka, T., and Aiba, S. (1986) Comparison of amino acid sequences of eleven different  $\alpha$ -amylases. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 23, 355-360
64. Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. and Kakudo, M. (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* 95, 697-702.
65. Janacek, S., Svensson, B. and Henrissat, B. (1997) Domain evolution in the  $\alpha$ -amylase family. *J. Mol. Evol.* 45, 322-331.
66. Kuriki, T., Takata, H., Okada, S., and Imanaka, T. (1991) Analysis of active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Bacteriol.* 173, 6147-6152.
67. Koshland, D.E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 28, 416-436.
68. Sinnott, M.L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 90, 1171-1202.
69. McCarter, J.D. & Withers, S.G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 885-892.
70. Tanaka, Y., Tao, W., Blanchard, J.S. and Hehre, E.J. (1994). Transition state structures for the hydrolysis of  $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride by retaining and inverting reactions of glycosylases. *J. Biol. Chem.* 269, 32306-32312.
71. Capon, B. (1969) Mechanisms in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* 69, 407-498.
72. Piszkiwicz, D. and Bruice, T.C. (1968). Glycoside hydrolysis. II. Intramolecular carboxyl and acetamido group catalysis in 13-glycoside hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 2156-2163.
73. Kaneko, H., Kuriki, T., Handa, S., Takada, T., Takata, H., Yanase, M., Okada, S., Umeyama, H., Shimada, J. (1998) How  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase achieve their perfect stereoselectivity. *Res. Commun. Biochem. Cell Mol. Biol.* 2, 69-89.
74. Blake, C.C., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C., Philips, D. C., and Sarma, V. R. (1967) Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* 167, 378-388.
75. Swift, H. J., Brady, L., Derewenda, Z. S., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Turkenburg, J. P. and Wilkinson, A. J. (1991) Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA)  $\alpha$ -amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr. B.* 47, 535-544.

76. Kuriki, T., Kaneko, H., Yanase, M., Takata, H., Shhuada, J., Handa, S., Takada, T., Umeyama, H., and Okada, S. (1996) Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* 271, 17321-17329.
77. Martin, G.G., Martin, A., Tsai, W., Hafner, J.C. (2011) Production of digestive enzymes along the gut of the giant keyhole limpet *Megathura crenulata* (Mollusca: Vetigastropoda). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 160. 365-373.
78. Hernández-Santoyo, A., Hernández-Arana, A., Arreguín-Espinosa, R., Rodríguez-Romero, A. (1998) Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 159, 203-216.
79. Hernández-Santoyo, A., Rojo-Domínguez, A., García-Hernández, E., y Rodríguez-Romero, A. (2000). Physicochemical properties and behavior in solution of three cellulases from *Haliotis fulgens*. *Prot. Pept. Letters*, 7, 389-396.
80. Rodolfo González Gatica. Caracterización fisicoquímica y estructural de dos alginasas de *Astraea undosa*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2004. UNAM. México
81. Mónica Viñas Casas. Estudios biofísicos y estructurales de una lectina multifuncional de *Mytilus edulis*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2005. UNAM. México
82. Beatriz Berenice Guinea Ramírez. Purificación y caracterización de una lectina de *Aplysia californica*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 2010.
83. Miller, G. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
84. Smith, P.K., Krohn, R.L. (1985) Measure of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry.* 150, 76-85.
85. Fuchs, B., Schiller, J. (2009) Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 83-98.
86. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
87. Pantoliano M.W., Petrella, E.C., Kwasnoski, J.D., Lobanov, V.S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B.A., Lane, P., Salemme, F.R. (2001) High-density

- miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* 6, 429-440.
88. Boivin, S., Kozak, S., Meijers, R. (2013) Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens, *Protein Expr. Purif.* 91, 192-206.
  89. Kelly, S.M., Price, N.C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1338, 161-185.
  90. Gotte, G., Libonati, M. (2014). *Protein Oligomerization, Oligomerization of Chemical and Biological Compounds*, Claire Lesieur (Ed.), ISBN: 978-953-51-1617-2,
  91. Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K., Davies, P.L. (2011) Novel dimeric  $\beta$ -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Struct Biol.* 11, 36.
  92. Ali, M.H., Imperiali, B. (2005) Protein oligomerization: How and why. *Bioorg Med Chem.* 13, 5013-5020.
  93. Markéta Laštovičková, , Josef Chmelik, Janette Bobalova (2009) The combination of simple MALDI matrices for the improvement of intact glycoproteins and glycans analysis. *Int. J. of Mass Spectrom.* 281, 82-88.
  94. Tey, L.H., Loveridge, E.J., Swanwick, R.S., Flitsch, S.L., Allemann, R.K. (2010) Highly site-selective stability increases by glycosylation of dihydrofolate reductase. *FEBS J.* 277, 2171-2179.
  95. Solá, R.J., Griebenow, K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 98, 1223-1245.
  96. Öberg, F., Sjöhamn, J., Fischer, G., Moberg, A., Pedersen, A., Neutze, R. (2011) Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *J Biol Chem.* 286, 31915-31923.
  97. Wang, S., Dong, Z.Y., Yan, Y.B. (2014) Formation of high-order oligomers by a hyperthermostable Fe-superoxide dismutase (tcSOD). *PLoS One.* 9, e109657
  98. Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy CS. (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol.* 5, 144-151.
  99. Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., Evilia, C. (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea.* 2013, 373275.

100. Hill, G. A., Macdonald, D. G. and Lang, X. (1997) Amylase inhibition and inactivation in barley malt using cold starch hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 19, 1139-1141.
101. Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Alkan, M. and Arslan, O. (2007) Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 67-73
102. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Applied Biochem.* 31, 135-152
103. Gupta, R., Gigars, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B. (2003) Microbial  $\alpha$ -amylase: A biotechnological perspective. *Process. Biochem.* 38, 1599-1616
104. Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C.R. and Pandey, A. (2004) Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 309-317
105. Leveque, E., Haye, B. and Belarbi, A. (2000) Cloning and expression of an  $\alpha$ -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *FEEMS Microbiol. Lett.* 186, 67-71
106. Dutta, T.K., Jana, M., Pahari, P.R., Bhattacharya, T. (2006) The effect of temperature, pH, and salt on amylase in *Heliodyptomus viduus* (Gurney)(Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turk. J. Zool.* 30, 187-195
107. Moranelli, F., Yaguchoi, M., Calleja G.B. and Nasim, A. (1987) Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem. Cell Biol.* 65, 899-908
108. Prakash, O., Jaiswal, N., Pandey, R. K. (2011) Effect of metal ions, EDTA and sulfhydryl reagents on Soybean amylase activity. *Asian Journal of Biochem.* 6, 282-290
109. Mar, S.S., Mori, H., Lee, J.H., Fukuda, K., Saburi, W., Fukuhara, A., Okuyama, M., Chiba, S., Kimura, A. (2003). Purification, characterization and sequence analysis of two alpha-amylase isoforms from azuki bean, *Vigna angularis*, showing different affinity towards beta-cyclodextrin sepharose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1080-1093
110. Kiran, K.K. and Chandra, T. S. (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus sp.* Strain TSCVKK. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 77, 1023-1031

111. Lo, H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, H.H. and Chang, C.T. (2001) Enzymatic properties of a SDS-resistant *Bacillus sp.* TS-23  $\alpha$ -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 36, 743-750
112. Diaz, A., Sieiro, C. and Villa, T.G. (2003) Production and partial characterization of a B-amylase by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Lett. Applied Microbiol.* 36, 203-207
113. Tatara, Y., Yoshida, T. and Ichishima, E. (2005). A single free cysteine residue and disulphide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- $\alpha$ -mannosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2101-2108
114. Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. and Legge, R.L. (2007) A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.* 79, 950-955
115. Lin, L.L., Chyau, C.C. and Hsu, W.H. (1998). Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnol. Applied Biochem.* 28, 61-68
116. Arakawa, T., Timasheff, S.N., (1985) Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction of proteins. *Biochemistry* 24, 6756-6762
117. Robyt, J. F. (2005) Inhibition, activation, and stabilization of  $\alpha$ -amylase family enzymes. *Biologia, Bratislava*, 60/Suppl. 16, 17-26
118. Lee, J.C., Timasheff, S.N., 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256, 7193-7201
119. Uversky, V.N., Dunker A.K. (2010) Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta.* 1804, 1231-1264.
120. Dyson, H.J., Wright P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 197-208.
121. Hazy, E., Tompa, P. (2009) Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins. *Chemphyschem.* 10, 1415-1419
122. Uversky, V.N., Gillespie J.R., Fink A.L. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* 41, 415-427.
123. Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol.* 43,1090-103

124. Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci.* 37, 509-16.
125. Van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev.* 114,6589-6631.
126. Babu, M.M., Van der Lee, R., De Groot, N.S., Gsponer, J. (2011). Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr Opin Struct Biol.* 21, 432-440.
127. Vavouri, T., Semple, J.I., Garcia-Verdugo, R., Lehner, B. (2009). Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell.* 138, 198-208.