



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Inmovilización de Proteínas en Bioplásticos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

Nydia Cinthya Flores Hernández



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **Gloria Diaz Ruiz**

VOCAL: Profesor: **Beatriz Ruiz Villafan**

SECRETARIO: Profesor: **Romina Rodriguez Sanoja**

1er. SUPLENTE: Profesor: **Oscar Hernández Meléndez**

2° SUPLENTE: Profesor: **Carmina Montiel Pacheco**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA:

Romina Rodriguez Sanoja

SUPERVISOR TÉCNICO :

Daniel Alejandro Guillen Santos

SUSTENTANTE (S):

Nydia Cinthya Flores Hernandez

Contenido

1. Lista de Abreviaturas	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	5
4.1 Amilasas y Módulos de unión a carbohidrato	5
4.1.1 Amilasas.....	5
4.1.2 Módulos de fijación a carbohidrato.....	7
4.1.3 Dominios de fijación a almidón.....	9
4.1.4 Alfa amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>	10
4.1.5 Aplicaciones biotecnológicas DFA.....	14
4.2 Almidón.....	16
4.2.1 Aplicaciones del almidón.....	19
4.3 Bioplásticos	20
5. Objetivos.....	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
6. Materiales y método.	24
6.1 Estrategia general.....	24
6.1.1 Identificación de la presencia de almidones en los bioplásticos.....	24
6.2 Material.....	26
6.3 Estabilidad de los bioplásticos en citrato-fosfatos pH=5	26
6.4 Lavado de los bioplásticos.....	27
6.5 Detección de la presencia de almidón en los bioplásticos.....	27
6.6 Expresión e identificación del DFA.....	28
6.7 Prueba Cualitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos.....	28
6.8 Prueba Cuantitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos	29
6.9 Ensayo de fluorescencia.....	30

7. Resultados y análisis	32
8. Conclusiones.....	44
9. Referencias	45
10. Apéndices.....	49

1. Lista de Abreviaturas

GFP	Proteína verde fluorescente
GH-H	Glucósido hidrolasas Clan H
GH-13	Glucósido hidrolasas familia 13
DFA	Dominio de Fijación a Almidón
MUC	Módulo de Unión a Carbohidrato
TPS	Almidón Termoplástico
UR	Unidades Repetidas
5UR	Cinco Unidades Repetidas

2. Resumen

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* presenta un dominio de fijación a almidón el cual tiene la capacidad de adsorberse a almidón insoluble. En años recientes se ha estudiado la aplicabilidad de un dominio derivado de este (DFAtag) como herramienta para la inmovilización de proteínas sobre gránulos de almidón; como medio de purificación y como vehículo de administración de vacunas. El presente trabajo determina mediante pruebas cualitativas y cuantitativas la capacidad del dominio de unirse a bioplásticos elaborados con almidón.

3. Introducción

Los bioplásticos son materiales con características semejantes al plástico de origen petroquímico, que pueden llegar a ser fabricados a partir de fuentes renovables (como almidón y celulosa), estos materiales pueden ser desintegrados por microorganismos, siendo una alternativa para sustituir los plásticos derivados del petróleo para elaborar empaques de alimentos, bolsas, cubiertos, etc. En los últimos años se han desarrollado bioplásticos a base de almidón mezclados con polivinilalcohol, ácido poliláctico y copolíesteres entre otros materiales, mezcla que es necesaria para mejorar sus propiedades mecánicas (Rahmat *et al.*, 2009).

La inmovilización de compuestos antimicrobianos sobre empaques de alimentos es una tecnología utilizada para el desarrollo de empaques activos y una manera innovadora para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos (Appedini *et al.*, 2002), manteniendo la calidad y la seguridad, lo cual ha despertado un gran interés en la última década. Entre las tecnologías utilizadas para la inmovilización de los compuestos antimicrobianos se encuentra la unión covalente, la unión iónica y mediante el revestimiento o mezclado del antimicrobiano con el material de empaque.

En los últimos años se demostró la capacidad de un dominio de fijación a almidón (DFA) para inmovilizar proteínas recombinantes sobre gránulos de almidón crudo. Dicha característica permitió el uso del DFA como etiqueta (DFA_{tag}) para la purificación de proteínas recombinantes sobre almidón y derivados (Guillén *et al.*, 2014). Además se observó que las proteínas así inmovilizadas son más resistentes al ataque de proteasas y a pH ácidos, lo que llevó a probar que los gránulos de almidón pueden ser utilizados como vehículo para la administración oral de vacunas y proteínas terapéuticas previamente inmovilizadas con el sistema DFA_{tag} (Guillén *et al.*, 2013).

Una aplicación que recientemente se explora, es el desarrollo de un empaque activo para alimentos, utilizando al DFA_{tag} para la inmovilización de una proteína antimicrobiana en un empaque elaborado con biopolímeros de almidón.

Este proyecto tiene como objetivo determinar si el DFA_{tag} es capaz de adsorberse a bioplásticos elaborados con almidón, partiendo de la hipótesis de que si el DFA es capaz de hacerlo sobre gránulos de almidón, también podrá hacerlo sobre bioplásticos que incluyen a este carbohidrato.

4. Antecedentes

4.1 Amilasas y Módulos de unión a carbohidrato

4.1.1 Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan al almidón, dando como productos oligodextrinas de diferentes tamaños (Asgher *et al.*, 2006). Esta familia de enzimas hidrolíticas está compuesta por alfa-amilasas, beta-amilasas, glucoamilasas, isoamilasas y glucotransferasas.

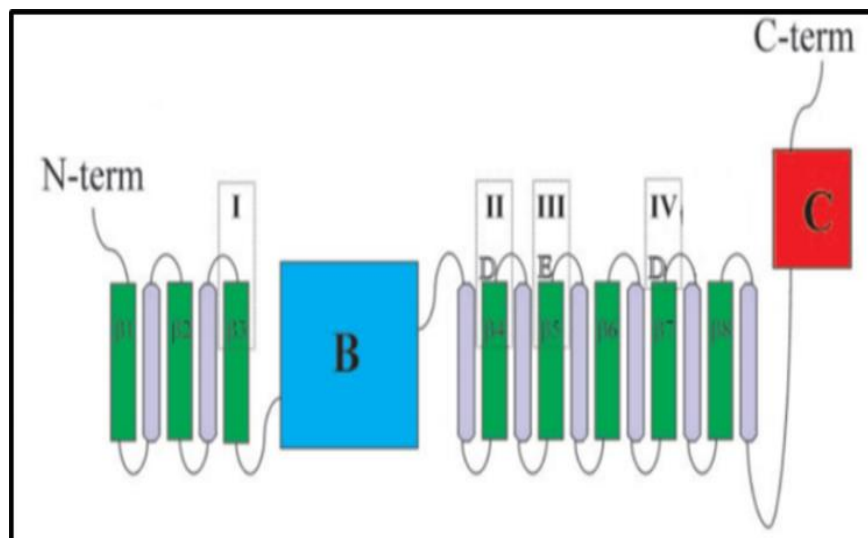


Figura 1. Diagrama topológico para las α-amilasas de la familia 13. Muestra la estructura de barril (α/β)₈ del dominio catalítico que empieza con la lámina β1 y termina con la hélice α8. El dominio B se localiza entre la lámina β3 y la hélice α3.

Los sitios aproximados donde se encuentran los residuos relacionados con la catálisis se indican con las letras D, E y D, C (van Hijum *et al.*, 2006).

La α-amilasa es un endoenzima que cataliza la hidrólisis al azar de los enlaces α,1-4 del almidón. Esta enzima pertenece a la familia 13 de las glucósido hidrolasas del clan GH-H. En general los miembros de GH13 son proteínas

multidominio (Figura1) formadas por un dominio A catalítico que consiste de 8 láminas β y 8 α hélices, que incluye un pequeño dominio B insertado entre la tercera lámina β y la tercera α -hélice del barril, este dominio puede estar implicado en la unión a Ca^{2+} y junto con el dominio A forma la bolsa del sitio activo. En el extremo C-terminal se localiza el dominio C en forma de β -sándwich. Se cree que este dominio estabiliza el dominio catalítico mediante la protección de los residuos hidrófobos del dominio A (MacGregor *et al.*, 2001).

El mecanismo catalítico generalmente aceptado para la α -amilasa es el de retención por doble desplazamiento (Figura 2). El mecanismo involucra a dos residuos catalíticos en el sitio activo; un ácido glutámico como catalizador ácido/base y un aspartato como nucleófilo.

El mecanismo involucra 5 pasos: (i) después de que el sustrato se ha unido en el sitio activo, el ácido glutámico en la forma de ácido dona un protón al oxígeno del enlace glucósido que se encuentra entre las dos moléculas de glucosa en los subsitios -1 y 1; por otra parte el aspartato nucleófilo ataca el C1 de la glucosa en subsitio -1; (ii) se forma un estado de transición seguido por la formación de un intermedio covalente; (iii) la molécula de glucosa protonada en subsitio 1 deja el sitio activo mientras que una molécula de agua o una molécula nueva ataca el enlace covalente entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato; (iv) se forma un nuevo estado de transición; (v) el glutamato acepta un hidrógeno de una molécula de agua o de la glucosa que se acaba de introducir en el subsitio 1, el oxígeno del agua o la molécula de glucosa en el subsitio 1 reemplaza el enlace entre la molécula de glucosa en subsitio -1 y hay formación de un nuevo grupo hidroxilo en la posición C1 de la glucosa en el subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glicosídico entre la glucosa en subsitio -1 y 1 (transglicosilación) (van de Maarel *et al.*, 2002).

Algunas de las enzimas que pertenecen al clan GH-H poseen además, dominios auxiliares no catalíticos conocidos en general como módulos de unión a carbohidratos (MUC).

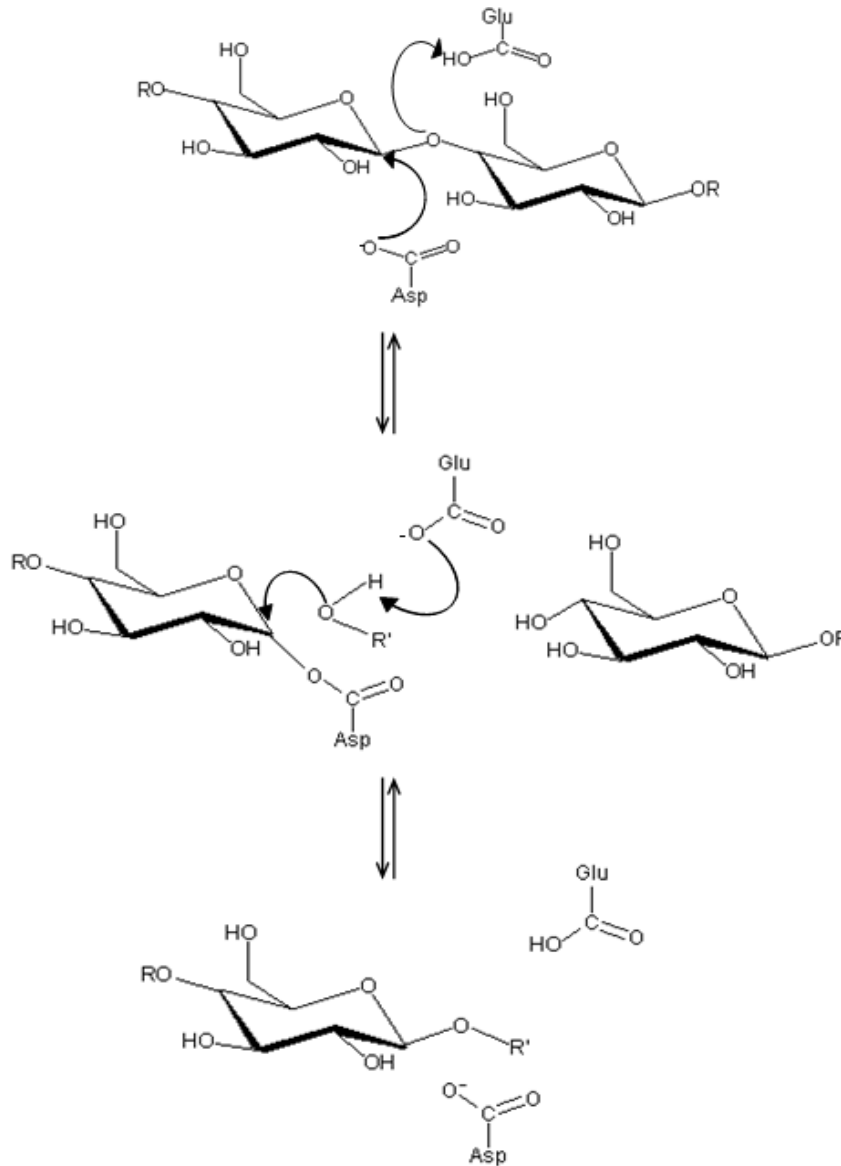


Figura 2. Mecanismo de doble desplazamiento empleado por las enzimas de la familia de las α -amilasas, cuando R' se trata de un hidrógeno se presenta hidrólisis, cuando R' se trata de un azúcar es transglicosilación.

4.1.2 Módulos de fijación a carbohidrato

Un módulo de unión a carbohidratos (MUC) se define como una secuencia de aminoácidos que es capaz de unirse a carbohidratos y que usualmente es

contigua a una enzima que actúa sobre un azúcar. Actualmente existen reportes de 43589 módulos, agrupados en 71 familias de acuerdo a la similitud en su estructura primaria (<http://www.cazy.org>).

Los MUC's se clasificaron previamente como dominios de unión a celulosa, ya que el descubrimiento inicial fue de módulos que se unían solo a este carbohidrato. No obstante, se realizó una reclasificación debido a que encontraron módulos que son capaces de unirse a carbohidratos distintos a la celulosa, como a la quitina, al xilano, y al almidón; este último nombrado como dominio de fijación a almidón (DFA).

Actualmente la clasificación en familias permite la identificación por secuencia de nuevas familias, en algunos casos predice la especificidad de unión del dominio, ayuda a identificar dominios funcionales y, a predecir plegamiento (Cantarel *et al.*, 2009). Una característica compartida por los MUC's es la conformación β -sándwich, con un número variable de láminas beta (Abe *et al.*, 2004).

La topología de los sitios de unión MUC-ligando, también se ha utilizado como criterio para clasificarlos en tres tipos diferentes: A, B y C (Boraston *et al.*, 2004). Los residuos de aminoácidos del tipo A se caracterizan por adoptar una superficie hidrófoba plana que se pueden unir a celulosa, quitina y muestra poca o nula afinidad por polisacáridos solubles (Nangy *et al.*, 1998). La arquitectura del tipo B está dada por un arreglo de hendidura donde los aminoácidos aromáticos interaccionan con las cadenas libres de polisacáridos que se acomodan en ella. Los CBMs del tipo B reconocen sustratos como β -1,3- glucanos, mezclas β - (1,3) (1,4)-glucanos, β -1,4-manano, glucomanano y galactomanano. Los tipo C se unen preferentemente a mono, di o trisacáridos por lo que carecen de las hendiduras como los de tipo B.

La función de los MUC's es aumentar la concentración efectiva de la enzima en la superficie del polisacárido mejorando la actividad enzimática (Bolam *et al.*, 1998). La eliminación de estos dominios conduce a una reducción, o en la supresión de

la unión a sustratos insolubles, lo que resulta en una pérdida parcial o completa de la actividad catalítica (Guillen *et al.* 2010).

4.1.3 Dominios de fijación a almidón

Los módulos que tienen la capacidad de unirse al almidón han sido clasificados dentro de las familias MUC20, MUC 21, MUC 25, MUC 26, MUC 34, MUC 41, MUC45, MUC48 MUC53, MUC58 y MUC69 (<http://www.cazy.org>) y se les denomina dominios de fijación a almidón (DFA). Estos módulos pueden encontrarse de forma individual o formando tandems con miembros de la misma familia o de diferentes familias (Figura 3).

La familia MUC20 ha sido la más estudiada y su función de unión a almidón se ha demostrado en varios casos, como en la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Sorimachi *et al.*, 1996), la ciclodextrin glucotransferasa de *Bacillus circulans* (Dijkhuizen *et al.*, 1995) y en la β -amilasa de *Bacillus cereus* (Mikami *et al.*, 1999) entre otras.

Los dominios de fijación a almidón están presentes en el 10% de las enzimas amilolíticas. Se encuentran en algunas α -amilasas bacterianas, fúngicas y de plantas, glucoamilasas fúngicas, en ciclodextrin-glucotransferasas y β -amilasas de bacterias (Janeček y Sevcik, 1999, Glaring *et al.* 2010). Sin embargo existen enzimas amilolíticas capaces de unirse y degradar almidón crudo sin un dominio funcional, como es el caso de la glucoamilasa de *Saccharomycopsis fibuligera* que presenta un sitio de unión a almidón que consiste en un residuo de tirosina (Gašperík *et al.*, 2005) y de dos isoenzimas α -amilasas de la cebada donde el sitio de unión es superficial y está compuesto por dos residuos de triptófano (Tibbot *et al.*, 2002).



Figura 3. Diferentes arquitecturas de las enzimas amilolíticas. En la figura se representan 6 de las 9 familias de dominios de fijación al almidón (CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34 y CBM41) (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005)

El DFA usualmente se localiza en la parte C-terminal de las enzimas, aunque hay algunas excepciones como es el caso de la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* (Yoshizumi y Ashikari, 1987) y de la pululanasa de *Thermotoga marítima* cuyo DFA se encuentra en la parte N-terminal.

4.1.4 Alfa amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

Existen bacterias ácido lácticas que son capaces de producir ácido láctico a partir de almidón, entre las cuales se encuentran bacterias del género *Lactobacillus* que

exhiben actividad amilolítica: *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. amylophilus*, *L. manihotivorans* y *L. amylolyticus* (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000).

Los genes de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans* fueron secuenciados y se encontró que comparten un 98 % de identidad. Estas enzimas están organizadas en dos dominios: un dominio catalítico y un dominio de fijación a carbohidrato (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2004). Esto se confirmó al transferir los primeros 401 aminoácidos de *L. amylovorus* a una cepa no amilolítica de *L. plantarum*, ésta adquirió la capacidad de degradar el almidón soluble, determinando que el extremo N-terminal contiene el sitio activo (Jore *et al* 1993). No obstante, al eliminar la parte C-terminal de la amilasa, esta pierde la capacidad de hidrolizar almidón insoluble (Figura 4), confirmando que el DFA se encuentra en la parte C-terminal (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000).

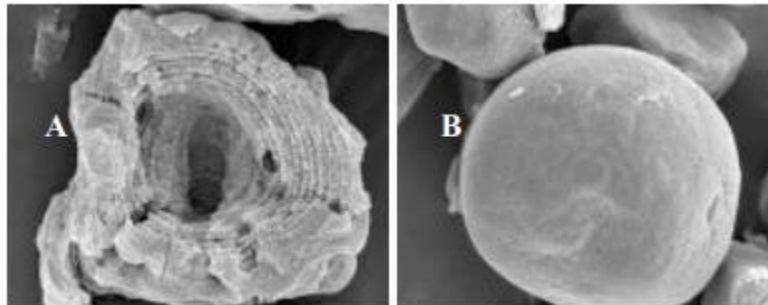


Figura 4. Fotografía al microscopio electrónico de barrido que muestra el efecto sobre gránulos de almidón de maíz de: A) α -amilasa entera, B) α -amilasa troncada (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000).

El DFA está formado por aproximadamente 500 aminoácidos organizados en módulos en tándem. *L. manihotivorans* y *L. plantarum* presentan 4 módulos idénticos de 98 (Morlon *et al*, 2000) y 104 aminoácidos respectivamente mientras que *L. amylovorus* presenta 5 módulos de 91 aminoácidos (Giraud *et al.*, 1997).

Entre los módulos de *L. manihotivorans* y *L. plantarum* hay regiones intermedias ricas en serinas y treoninas (Figura 5), se piensa que estas regiones incrementan la movilidad de los módulos (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005), sin embargo el DFA de *L. amylovorus* carece de estas regiones (Santiago *et al.*, 2005).

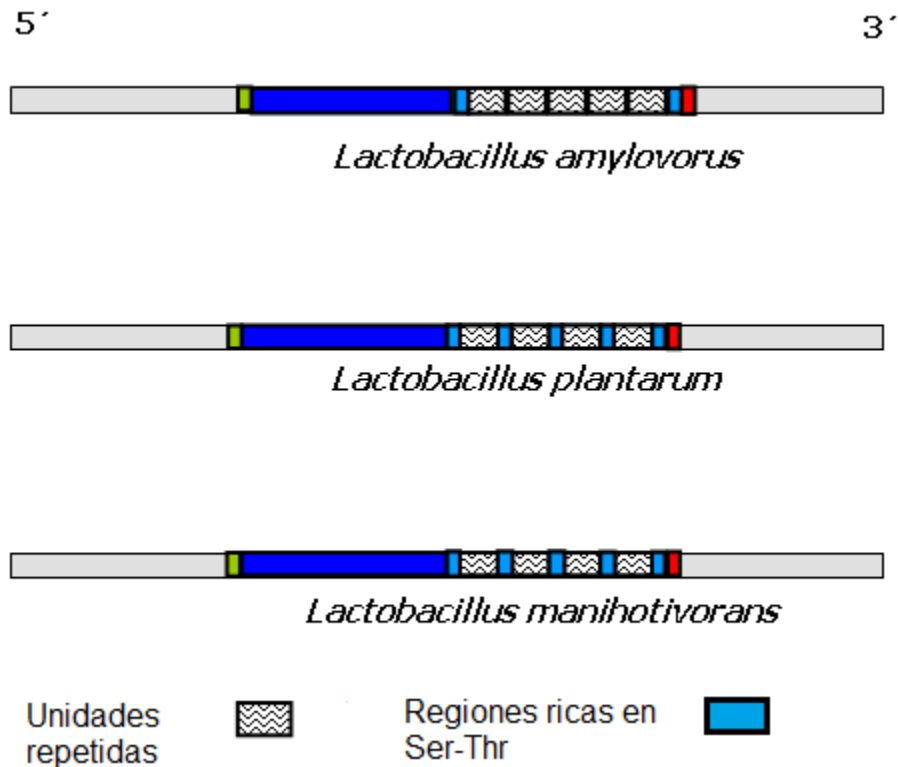


Figura 5. Representación de los genes de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, donde el DFA de *L. amylovorus* presenta 5 UR mientras que los de *L. manihotivorans* y *L. plantarum* contienen 4 UR.

Los módulos que conforman el DFA de las amilasas de *Lactobacillus* mencionados pertenecen a la familia 26 de los MUC's. Boraston y col. en el 2006 determinaron la arquitectura del MUC26 de una amilasa formadora de maltohexaosa de *Bacillus halodurans* (C-125), presentando una estructura plegada de beta sándwich con 9 láminas β (Figura 6).

El MUC26 posee un sitio de unión a almidón formado por el triptofano (W36) y la tirosina (Y25) que establecen interacciones hidrofóbicas con los anillos de piranosa del carbohidrato (Figura 7). Mientras que los residuos de tirosina (Y23), glutamina (Q71), glicina (G76) y glutamato (E77) forman puentes de hidrogeno para estabilizar el complejo (Giraud *et al.*, 1997; Boraston *et al.*, 2006).

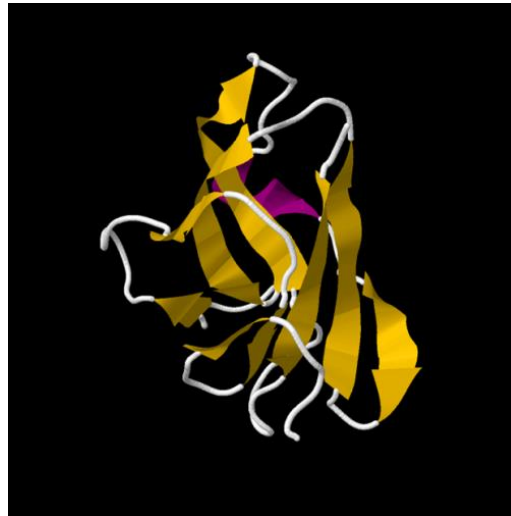


Figura 6. Estructura CBM 26 de *Bacillus Halodurans* (www.cazy.org)

El DFA de *L. amylovorus* como se dijo anteriormente se compone de cinco módulos idénticos en tándem, que permiten la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima solubilizada permitiendo la hidrólisis del almidón insoluble. Para entender el papel de los módulos en el fenómeno de adsorción se investigó la capacidad de unión de los péptidos correspondientes a uno, dos, tres, cuatro y cinco módulos. Los ensayos de unión mostraron que un módulo es capaz de adsorberse a gránulos de almidón y que existe un aumento de la capacidad de adsorción como una función del número de módulos (Guillén *et al.*, 2007).

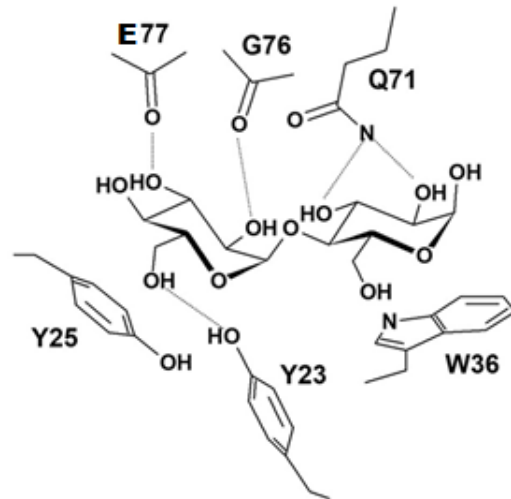


Figura 7. Esquema de las interacciones del CBM26 de *Bacillus halodurans* con maltosa (Boraston *et al.*, 2006).

4.1.5 Aplicaciones biotecnológicas DFA

La principal aplicación de los DFA's está relacionada con la purificación y la inmovilización de proteínas biológicamente activas. El almidón es una atractiva matriz de purificación e inmovilización, principalmente debido a su combinación de las excelentes propiedades físicas y bajo costo.

El DFA de *L. amylovorus* se ha utilizado como etiqueta (DFAtag) para la purificación de proteínas de fusión. El fragmento C de la toxina tetánica (Tc) fusionado al DFAtag se logró purificar utilizando tres almidones: maíz, arroz y patata mostrando un grado de purificación mayor que la fusión de Tc a tallo de histidinas (Guillén *et al.*, 2013).

Como una posible herramienta para el campo de la biología celular y molecular se fusiono una proteína verde fluorescente (GFP) al DFA. Esta proteína proviene de

la pensamiento de mar *Renilla reniformis* y presenta un cromoforo 4-(p-hidroxibenzilideno) imidazolidin-5-ona formada por los residuos 65-67, los cuales corresponden a los aminoácidos serina, tirosina y glicina (Figura 8) (Tsien 1998). La proteína fusionada se incubó con gránulos de almidón y después de realizar una serie de lavados, estos se observaron en el microscopio obteniendo una imagen de gránulos fluorescentes (Guillén *et al.*, 2014)

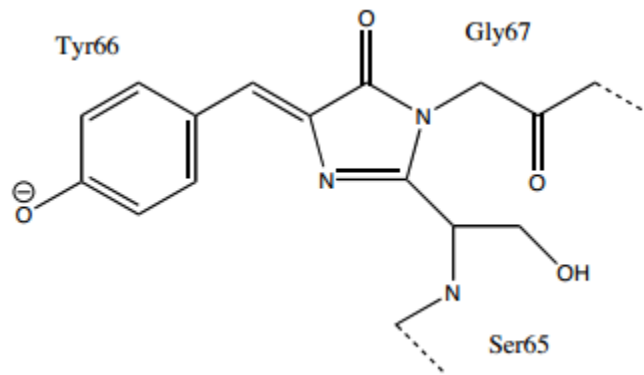


Figura 8. Cromoforo de la GFP, en donde intervienen los aminoácidos Ser 65, Tyr 66, y .Gly 67

En la bioingeniería del almidón los DFA's se utilizan como una herramienta de anclaje de proteínas dentro de los gránulos de almidón durante su biosíntesis, con el objetivo de obtener nuevas o mejores funciones que no pueden ser obtenidas de manera convencional. Al introducir una repetición en tándem de un dominio de almidón construida por dos copias idénticas de un DFA de una ciclodextrina glicosiltransferasa de *Bacillus circulans*, en patata fue posible disminuir el tamaño de los gránulos de almidón. Este almidón se puede utilizar en la fabricación de películas de plástico biodegradables (Ji *et al.*, 2004)

4.2 Almidón

El almidón es un polisacárido que funciona como reserva energética en plantas se encuentra principalmente en cereales (maíz), tubérculos (papa) y legumbres. Esta macromolécula se produce en una forma granular y cristalina, consiste de dos polímeros estructuralmente distintos, la amilosa y la amilopectina.

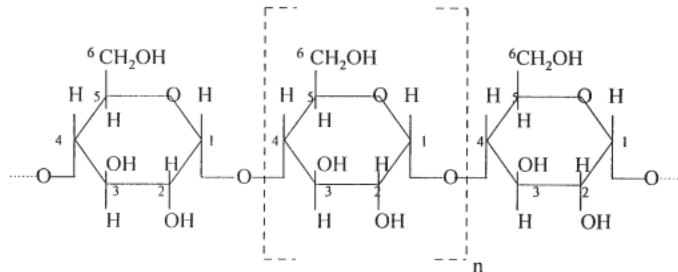


Figura 9. Estructura de la molécula de amilosa

La amilosa es una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces α ,1-4 (Figura 9) con un peso molecular de 10^6 Da. Posee una estructura helicoidal en la que cada vuelta de la hélice presenta 6 unidades de glucosa. Al interior de la hélice se orientan los átomos de hidrógeno, lo que le da un cierto carácter hidrofóbico, que le permite formar un tipo de complejo con yodo (Voet *et al.*, 2004).

La cadena de amilopectina constituye entre un 72 a 78% del almidón; está compuesta de enlaces glucósidos α ,1-4 con ramificaciones α ,1-6 (Figura 10) con un peso molecular de 10^9 Da.

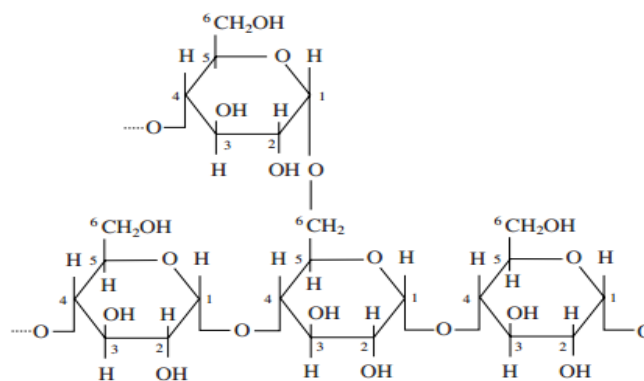


Figura 10. Estructura de la molécula de amilopectina

Las cadenas de amilopectina pueden clasificarse en términos de su longitud y en la posición dentro del granulo, en cadenas A y B. Las cadenas A están unidas a las cadenas B por enlaces α 1-6, que a su vez se pueden vincular con otras cadenas B o a la “columna vertebral” de la amilopectina llamada columna C (Figura 11). Las cadenas A constan de 6 a 12 unidades, y las cadenas B se denominan B1-B4, presentando de 20-24, 42-48, 69-75 y 101-119 unidades respectivamente (Hizukuri *et al.*, 1986).

El modelo comúnmente aceptado para la amilopectina es el modelo de cluster, en el cual las cadenas de glucosa se arreglan de manera radial en el gránulo, con los extremos no reductores apuntando hacia la superficie, organizadas de manera alternada en lamelas cristalinas y amorfas, con una periodicidad de 9 nm (Jenkins *et al.*, 1993). El clúster está conformado por tres tipos de cadenas: A, B y C. Las cadenas B son aquellas que se encuentran ramificadas hacia el interior del clúster, mientras que la cadena A no presenta ramificaciones y se une mediante enlaces α -1,6 a las cadenas B. La cadena que contiene al extremo reductor del clúster se le conoce como cadena C. Las cadenas A y B forman dobles hélices, en las que cada vuelta de la hélice está formada por seis moléculas de glucosa (Hancock *et al.*, 2000)

Los gránulos de almidón tienen una organización en capas alternadas denominadas anillos de crecimiento radial que comprenden lamelas cristalinas y amorfas de 120-400 nm de espesor (Cameron *et al*, 1992). Las dobles hélices se encuentran en la lamela cristalina mientras que los puntos de ramificación de las moléculas de amilopectina en las lamelas amorfas (Donald *et al.*, 2001).

Se ha demostrado por difracción de rayos X dos principales estructuras cristalinas, la estructura cristalina tipo A de los almidones de cereales como trigo y arroz, y la estructura de tipo B de los tubérculos y frutas (Zhang *et al* , 2013).

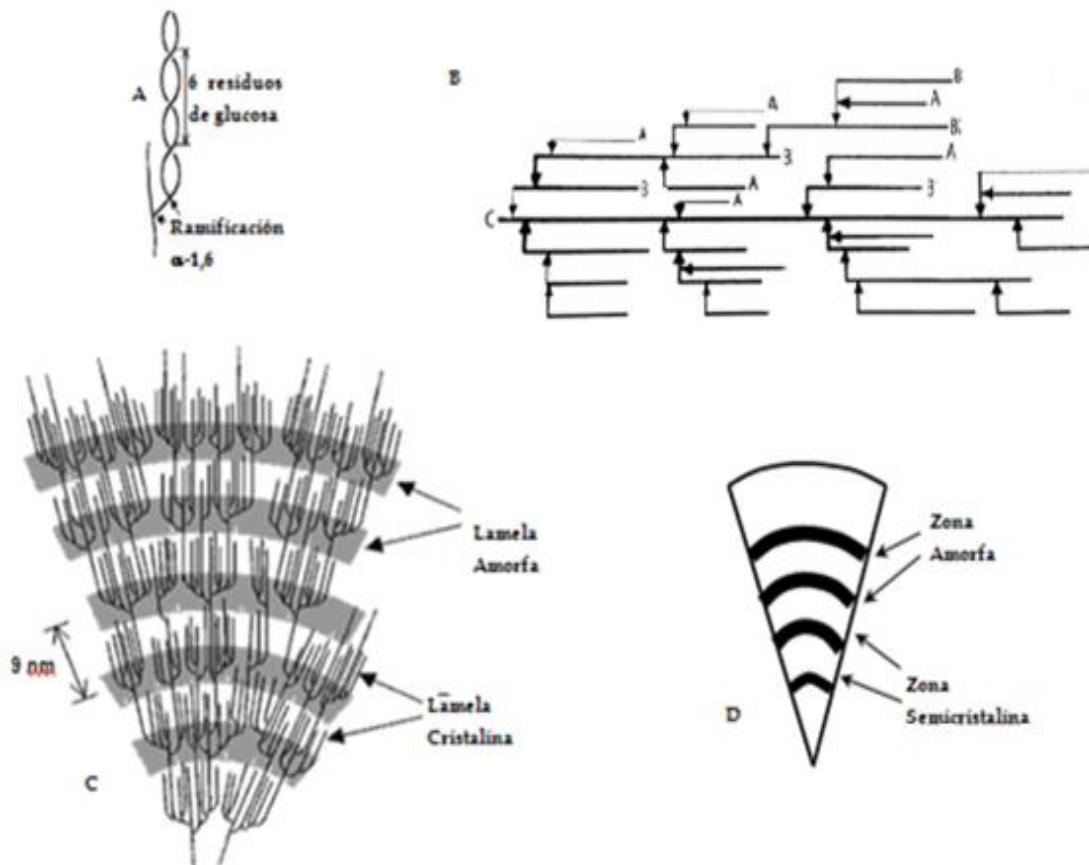


Figura 11. Organización del gránulo de almidón. A) Representación de los enlaces $\alpha-1,6$ en el polímero de glucosa. B) Organización de la molécula de amilopectina. C) Modelo de clúster de la amilopectina en la zona cristalina. D) Corte de un gránulo de almidón mostrando los anillos de crecimiento consistentes de las zonas cristalinas y amorfas.

En la estructura A las dobles hélices se empaquetan en una celda unitaria monoclinica con un bajo contenido de agua mientras que la estructura tipo B se empaquetan en una celda hexagonal con un núcleo helicoidal hidratado (Buleon *et al*, 1998). Las estructuras de tipo A y B están representados esquemáticamente en la Figura 12.

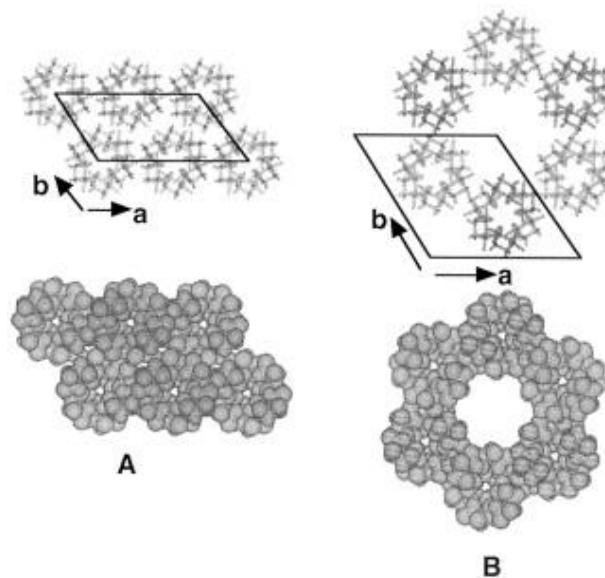


Figura 12. Estructura cristalina tipo A y tipo B del almidón

4.2.1 Aplicaciones del almidón

El almidón además de ser parte de la alimentación humana, tiene muchas aplicaciones industriales. Se utiliza principalmente como agente espesante, y gelificante en la industria de alimentos y como adhesivo y aglomerante en la industria farmacéutica. Otra aplicación importante en la industria alimentaria es la obtención de jarabes de fructosa mediante la hidrólisis acida de almidón a glucosa seguido de una isomerización (Salcedo *et al.*, 2009).

También a partir del almidón de maíz, papa y yuca se puede obtener etanol (O'Brien y Wang, 2008), el cual puede utilizarse como combustible, solo, o bien mezclado en cantidades variables con gasolina.

Recientemente se ha utilizado el almidón como materia prima en la producción de bioplásticos, debido a su disponibilidad en productos como el maíz, la yuca y la papa, que son altamente cultivados a nivel mundial y a bajo costo.

4.3 Bioplásticos

El consumo mundial actual de los plásticos sintéticos provenientes del petróleo es de más de 200 millones de toneladas, con un incremento anual de aproximadamente el 5% (Siracusa *et al.*, 2008). Para el periodo de 2010 a 2016, se espera que el consumo global de plásticos crezca, con un incremento anual del 4%. La alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición bacteriana los convierte en unos residuos difíciles de eliminar convirtiéndose en un problema ambiental. Por ejemplo el polietileno y el polipropileno, dos de los plásticos más utilizados, tardan hasta 500 años en descomponerse (Gross *et al.*, 2002). Por otro lado el petróleo es un recurso no renovable y ha presentado fluctuaciones en su precio. Ante estas problemáticas en los últimos años se ha prestado gran atención en el desarrollo y uso de bioplásticos.

Los bioplásticos de acuerdo con la Asociación Europea de Bioplásticos es una familia de materiales clasificados en dos principales categorías: los plásticos procedentes de recursos renovables y los polímeros biodegradables (www.plasticeurope.es).

Los polímeros del primer grupo no precisan ser biodegradables, aunque la mayoría lo son. Los del segundo grupo no necesariamente tienen que estar basados en materias primas renovables.

Los Bioplásticos procedentes de recursos renovables provienen de cuatro grandes fuentes:

- Origen animal (colágeno/gelatina)
 - Origen marino (quitina/quitosan)
 - Origen agrícola (almidón , celulosa)
 - Origen microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoatos)
- (Tharanathan, 2003).

La ASTM (American Society for testing Materials) D-5488-944 define la biodegradabilidad como a la capacidad de un material de descomponerse en CO₂, metano, agua y componentes orgánicos, o biomasa, en el cual el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos.

Dentro de los polímeros biodegradables de origen petroquímico encontramos a la policaprolactona, poliésteramidas, copoliésteres alifáticos y copoliésteres aromáticos (Jacob *et al.* 2007). Estos materiales son susceptibles a la degradación hidrolítica (Leja *et al.*, 2010).

4.3.1 Bioplásticos de almidón

La plastificación del almidón se obtiene por la disrupción estructural que resulta de una disminución de los cristales durante el proceso de extrusión y la acción de plastificantes (glicerina, sorbitol, xilitol, entre otros) emergiendo un nuevo tipo de material conocido como almidón termoplástico (TPS) (Acosta *et al.*, 2005).

Sin embargo, el plástico a base de almidón tiene algunos inconvenientes, incluida la mala estabilidad a largo plazo causados por la sensibilidad a la humedad y pobres propiedades mecánicas. Estos problemas se han reducido realizando mezclas de este bioplástico con plásticos biodegradables y de origen petroquímico.

Por ejemplo, el polietileno es uno de los polímeros que se ha estudiado para realizar mezclas con almidón, sin embargo se ha observado que su baja polaridad conduce a mezclas de baja compatibilidad presentando pobres propiedades físicas. Los plásticos de almidón y polietileno pueden contener hasta un 30% de almidón, resultando un material parcialmente biodegradable (Villada *et al.*, 2007).

Las mezclas de polivinil alcohol (PVA) y almidón son de los plásticos biodegradables más populares. Gracias a la naturaleza hidrófila del PVA es compatible con el almidón. Esta mezcla muestra una mejora en la resistencia a la tracción y alargamiento comparada con el TPS puro (Fishman *et al.*, 2006). Recientemente se ha reportado que 55 especies de microorganismos (incluidos bacterias, hongos y levaduras) participan en la degradación de polivinil alcohol (Leja *et al.*, 2009).

La mezcla de almidón con poliésteres alifáticos mejoran su procesabilidad y biodegradabilidad, para ello, los poliésteres más adecuados son la policaprolactona o el ácido poliláctico. Estas mezclas se utilizan para fabricar láminas y películas para embalaje (Schoeter 1992).

Algunos materiales ya se utilizan comercialmente, la empresa Plantic Technologies Ltd, utiliza almidones modificados junto con otros ingredientes poliméricos, no poliméricos y plastificantes. Este material en composta se degrada un 90% en 180 días. Se utiliza para el envasado de alimentos y productos con actividad de agua de 30 a 70%. (<http://www.plantic.com.au/>).

Por otro lado Sphere fabrica bolsas (para basura y autoservicio), embalaje para alimentos y cubiertos a partir de Bioplast, una mezcla de fécula de patata, caña y un copoliéster. Los productos Bioplast son 100 % biodegradables, y compostables, una bolsa puede desaparecer en menos de 180 días. (<http://www.sphere-spain.es>)

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de adsorción que tiene el DFAtag sobre bioplásticos elaborados a base de almidón.

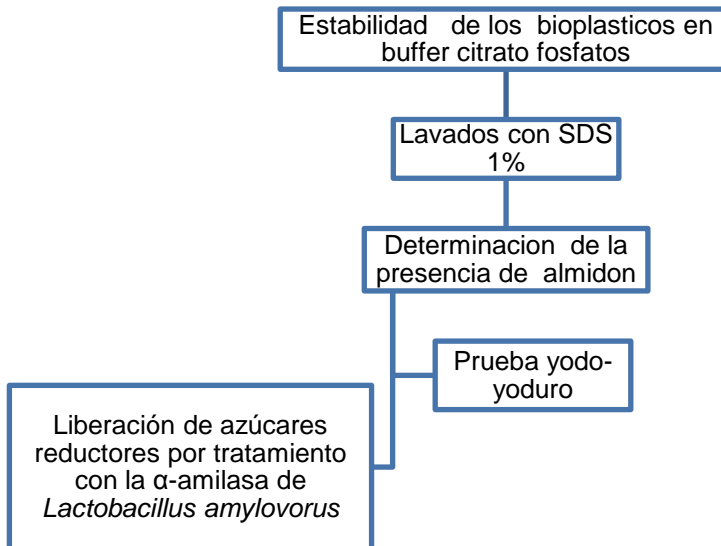
5.2 Objetivos específicos

- Detectar la presencia de almidón en los bioplásticos.
- Establecer la capacidad de adsorción del DFA mediante una prueba cualitativa y cuantitativa de adsorción a bioplásticos.
- Establecer la capacidad de adsorción a bioplásticos del DFA fusionado a una proteína (GFP-DFA).

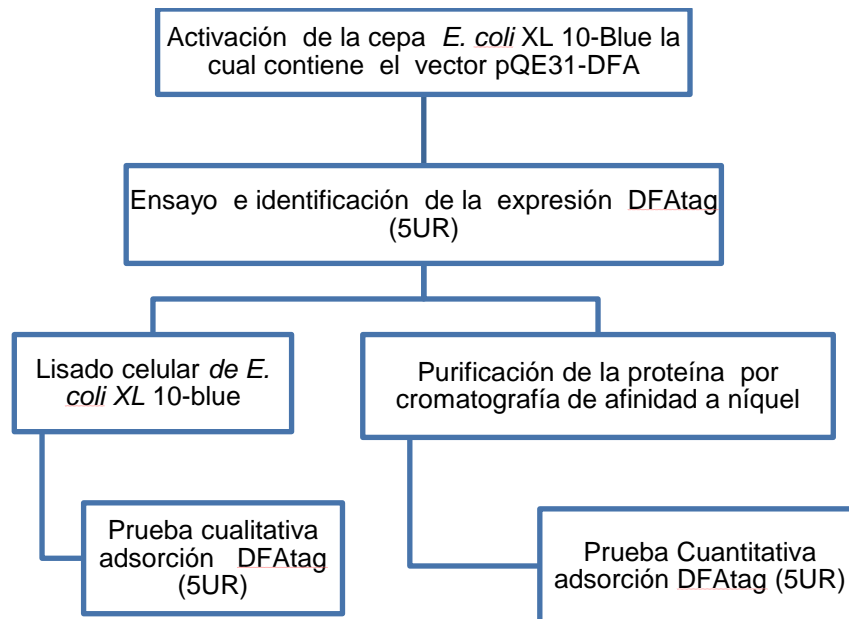
6. Materiales y método.

6.1 Estrategia general

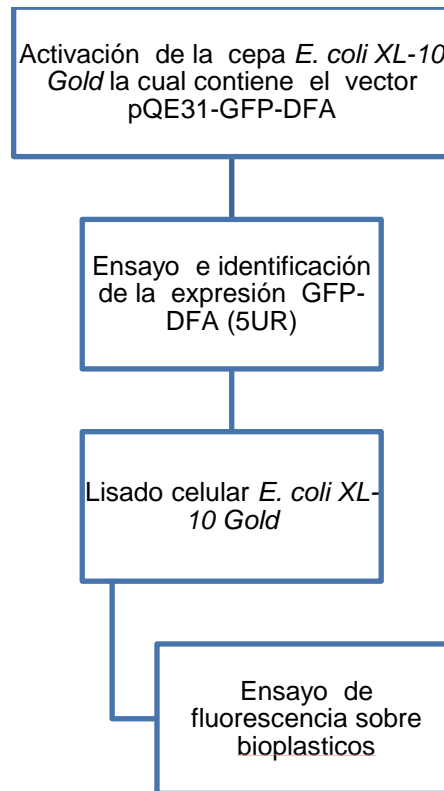
6.1.1 Identificación de la presencia de almidones en los bioplásticos



6.1.2 Capacidad de adsorción del DFA a bioplásticos



6.1.3 Ensayo de fluorescencia con DFA-GFP sobre los bioplásticos



6.2 Material

Tabla 1. Bioplásticos comerciales y no comerciales

	Muestra	Características
Bioplásticos no comerciales (Donación del Dr. Carlos Regalado de la Universidad de Queretaro)	Bioplástico 1	Almidón acetilado + sorbitol – nanoemulsión de ácido oleico.
	Bioplástico 2	Almidón oxidado + sorbitol– nanoemulsión de ácido oleico.
	Bioplástico 3	Almidón waxy + sorbitol - nanoemulsión de ácido oleico.
	Bioplástico 4	Almidón waxy + sorbitol- nanoemulsión de ácido oleico y agua.
Bioplásticos comerciales	Bioplástico 5	Marca: SPHERE 100% Biodegradable compostable fabricada a partir de almidón de patata. Espesor: 18 micras.
	Bioplástico 6	Marca: Alfapac-SPHERE 100% Biodegradable compostable fabricada a partir de almidón de patata. Espesor: 22 micras.

6.3 Estabilidad bioplásticos citrato-fosfatos pH=5.

A los bioplásticos se les realizó una prueba de estabilidad con la finalidad de determinar si presentaban alguna desintegración en el buffer de trabajo (citrato-fosfatos pH 5).

Se cortaron los diferentes bioplásticos en cuadros de 0.6 x 0.6 cm, y se sumergieron en 200 µl de buffer citratos-fosfatos pH 5 por 30 minutos y 2 horas leyendo a cada tiempo DO a 600 nm.

6.4 Lavado de los bioplásticos

Los bioplásticos que no mostraron desintegración en buffer citrato-fosfatos pH=5, se cortaron en círculos pequeños de 5 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado. Se pesaron 25 mg de estos círculos y se sumergieron en 2 ml de SDS 1% por 10 minutos con agitación, esto con el fin de eliminar materia extraña. Trascurridos los 10 minutos se retira el SDS y se agregan 2 ml de agua destilada por 10 minutos con agitación, estos lavados se realizan 6 veces. Después del último lavado se adicionan 2 ml de buffer citrato fosfatos 0.1 M y se deja en agitación por 2 horas. Se retiran los círculos de bioplástico y se dejan secar a temperatura ambiente.

6.5 Detección de la presencia de almidón en los bioplásticos

Prueba Yodo Yoduro

Con la finalidad de comprobar la presencia de almidón en los bioplásticos se decidió sumergirlos en 500 µl de una solución 4x de yodo/yoduro. El yodo forma un complejo coloreado en presencia de almidón. Como control se utilizó un plástico de ácido poli-láctico.

Liberación de azúcares reductores de los bioplásticos por acción de la α -amilasa de *L. amylovorus*

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

Después de la incubación de un preinóculo de *L. amylovorus* en medio MRS, se inoculó al 1% un litro del mismo medio y se incubó por 16 horas a 37°C. Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante el cual se hizo pasar por una columna de afinidad de sefaroza acoplada con β - ciclodextrina. La proteína adsorbida se eluyó con buffer citratos fosfatos pH=5 con β - ciclodextrina (9mg/ml) y se

recuperó en fracciones de 1 ml (Apéndice II.C). Se verificó la pureza de las 9 fracciones obtenidas en un gel de SDS-PAGE al 7.5% (Apéndice II.A).

Ensayo para determinar la liberación de azúcares reductores en los bioplásticos.

La α -amilasa purificada presentó una actividad específica de 4604.96 U/mg se incubó con 40 μ l de una solución de almidón soluble, almidón insoluble; ambas a una concentración de 12 mg/ml y con 2 mg de los bioplásticos 5 y 6 por 10 minutos a 63°C y se determinó la presencia de azúcares reductores por el método DNS (Apéndice II.D)

6.6 Expresión e identificación del DFA

Se creció un pre-inóculo de *E. coli* XL1-blue con el vector pQE31-DFA (5UR) en medio LB (Apéndice I.A.) con ampicilina (100 μ g/ml) por 24 horas a 29°C con agitación, después de la incubación, se inoculó por triplicado al 1 % en 10 ml de medio LB-amp₁₀₀ y se incubó a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se realizó la inducción de la expresión del DFA_{tag} a una DO_{600nm} aproximada de 0.6, adicionando IPTG a una concentración 0.4 mM. Se tomaron muestras de 250 μ l a las 0, 2, 4 y 14 horas y se analizaron en un Western-Blot (Apéndice II.B) para identificar la proteína.

6.7 Prueba cualitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos

Utilizando la capacidad del DFA de unirse al almidón insoluble se buscó si el DFA se podía adsorber específicamente a los bioplásticos como lo hacía al almidón insoluble a partir de una mezcla compleja como es un lisado celular.

Las células de *E. coli* XL1 blue transformadas con el vector pQE31- DFA fueron crecidas e inducidas a condiciones óptimas establecidas en 500 ml de medio LB , posteriormente se colectaron por centrifugación obteniendo el botón celular , el cual fue lisado por sonicación (Apendice II.E). Se incubaron 300µL de lisado celular con 10 µL de una solución de almidón insoluble (100 mg/ml) y con 0.8 mg de los bioplásticos 5 y 6 por 2 horas. Por otra parte se incubaron 300 µL de lisado celular con maltosa a una concentración de 20 Mm con la misma concentración de almidón y la misma cantidad de los bioplásticos mencionada anteriormente, por 2 horas con agitación suave (Apendice II.F).

Después de la incubación se centrifugó por 4 minutos a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante, el pellet de almidón y los bioplásticos se lavaron con 500 µL de buffer citrato fosfatos 0.1M pH=5 , estos lavados se realizaron 10 veces, con el fin de retirar proteínas con adsorción inespecífica. La proteína adsorbida al almidón y a los bioplásticos fue eluida con 25 µL de β- ciclodextrina a una concentración de 9 mg/ml. Estas eluciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10 %.

6.8 Prueba cuantitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos

Para realizar la prueba cuantitativa el DFA fue primero purificado. Las células de *E. coli* XL1-blue con el vector pQE31- DFA fueron crecidas en las condiciones establecidas en el punto 6.7 en dos matraces con 500ml de medio LB, Las células colectadas por centrifugación se lisaron por sonicación (Apéndice II.D). El lisado celular se hizo pasar por una columna de sefarosa-niquelada, aprovechando la interacción entre las histidinas fusionadas al DFA y el níquel de la columna. La elución de la proteína se realizó con buffer fosfatos 20 mM con imidazol 250 mM. Las 23 fracciones de 1 ml recolectadas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%.

Se tomaron 200 μ l de una solución stock de DFA a una concentración de 0.75 mg/ml y se incubaron por 2 horas con agitación suave con 0.8 mg de los bioplásticos. Por otra parte se incubó 200 μ l de una solución de BSA (1mg/ml) con la misma cantidad de bioplástico, a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se estableció la proteína adsorbida por la diferencia de concentraciones entre la proteína inicial y la proteína no adsorbida. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Biuret (Apéndice II.H)

6.9 Ensayo de fluorescencia

Expresión e identificación de GFP-DFA

Se creció un pre-inóculo de *E. coli XL10- Gold* con el vector pQE31- GFP-DFA (proteína verde fluorescente fusionada al DFA) en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) por 12 horas a 29°C con agitación, después de la incubación, se inocularon al 1 % en 10mL de medio LB con la misma concentración de ampicilina y se incubó a las mismas condiciones mencionadas anteriormente, se indujo la expresión de GFP-DFA a una densidad óptica a 600 nm de 0.6, adicionando IPTG a una concentración 0.4 m M y se muestreó a las 0, 2, 4, 6, 8 horas. Las muestras se analizaron en un Western-Blot para asegurar la identidad de la proteína.

Ensayo de fluorescencia

Se hicieron crecer en 500 mL de medio LB *E. coli XL10- Gold* pQE31- GFP-DFA, *E. coli XL1-blue* pQE31-DFA y *E. coli XL10- Gold* pQE31-GFP, la expresión se indujo con las condiciones óptimas establecidas, se recuperó el botón celular. Las células se lisaron por sonicación para obtener el extracto celular. Posteriormente se incubó 1.5 ml del extracto celular por dos horas con 2 mg de los bioplásticos y con 50 μ L de una solución de almidón insoluble (100mg/ml). Se realizaron 3

lavados con 1mL de buffer citrato-fosfatos 0.1 M pH=5. Posteriormente se observó fluorescencia en un microscopio Nikon Optiphot-2 utilizando un filtro FITC (Apendice II.J).

7. Resultados y análisis

Estabilidad de los bioplásticos .

Se determinó la estabilidad de los bioplásticos en buffer citrato-fosfatos pH= 5. Los plásticos no comerciales se desintegraron a los 30 minutos de incubación, a diferencia de los bioplásticos comerciales que conservaron su integridad hasta las 2 horas que se probaron. De acuerdo con estos resultados se tomó la decisión de realizar los ensayos posteriores con los bioplásticos comerciales.

Detección de la presencia de almidón en los bioplásticos

De acuerdo con la información proporcionada por la empresa Sphere los bioplásticos comerciales están elaborados con almidón de patata. En un intento de comprobar su presencia, se realizó una prueba de yodo-yoduro y de liberación de azúcares reductores por hidrólisis con la α -amilasa de *L. amylovorus*.



Figura 14. Prueba Yodo-yoduro para determinar la presencia de almidón en los bioplásticos

El yodo es capaz de formar complejos tanto con la amilosa como con la amilopectina. El complejo yodo amilosa es de color azul mientras que la amilopectina forma un complejo color rojo. En ambos bioplásticos se observó un color rojizo, lo que comprobaría la presencia del polímero en las bolsas (Figura 14).

Para el ensayo de liberación de azúcares reductores de los bioplásticos se utilizó la α -amilasa pura de *L. amylovorus*. La purificación se realizó a través de la adsorción de la enzima a una columna de β -ciclodextrina, y su posterior elución con buffer citrato fosfatos 0.1 M pH=5 con β -ciclodextrina 9 mg/ml. Las fracciones obtenidas después de ser dializadas se evaluaron en un gel SDS-PAGE al 7,5% (Figura 15) donde se observa la integridad de la proteína y su pureza.

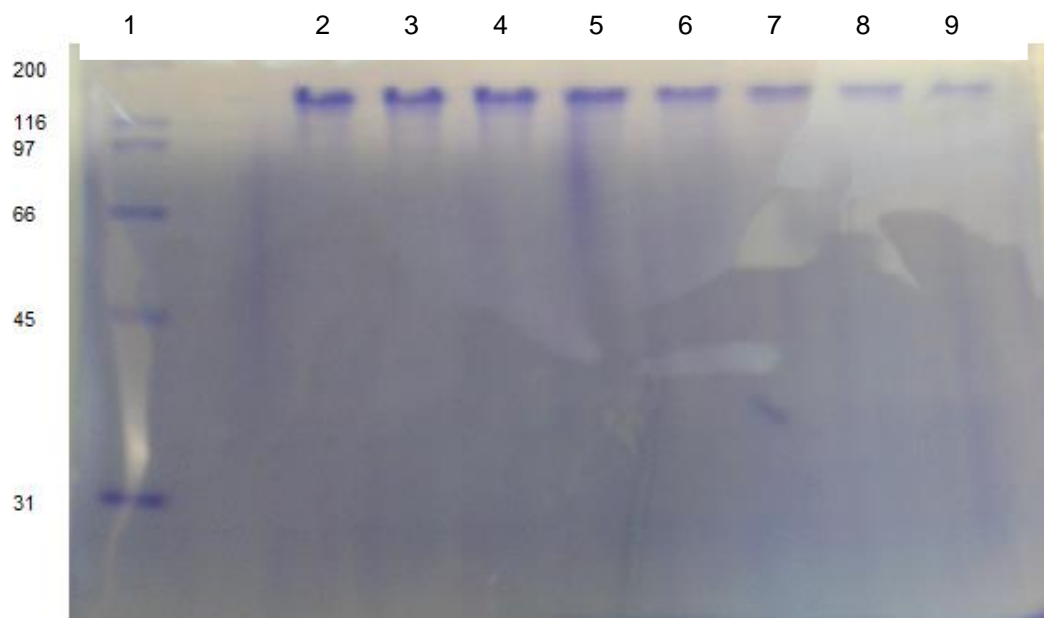


Figura 15 Análisis de la purificación de la α -amilasa de *L. amylovorus* en gel SDS-PAGE al 7,5% Carril1: Marcador de peso molecular Range (BIO-RAD), Carril 1-9: Fracciones de elución obtenidas en la purificación.

La α -amilasa purificada se incubó con almidón soluble, almidón insoluble y los bioplásticos comerciales por 10 minutos a 63°C, los azúcares reductores

liberados por la acción de la enzima fueron cuantificados por el método de DNS (Tabla 2). Esto nos permite confirmar si en la composición de los bioplásticos hay presencia de almidón, con el previo conocimiento de que la α -amilasa es capaz de hidrolizar este carbohidrato, aún insoluble.

Tabla 2. Resultados de la liberación de azúcares reductores por los bioplásticos en presencia de α -amilasa de *L.amylovorus*

Muestra	Mol glucosa liberada/mol de proteína
Almidón soluble	1.81×10^9
Almidón insoluble	3.14×10^7
Bioplástico 5	1.56×10^7
Bioplástico 6	1.23×10^7

Como se sabe la α -amilasa es capaz de hidrolizar almidón insoluble, aunque la liberación de azúcares reductores es mucho mayor en almidón soluble. En los bioplásticos se observa una liberación de azúcares reductores menor que en el almidón soluble e insoluble, sin embargo esto nos permite determinar que el almidón es parte de la composición de dichos bioplásticos. La cantidad de azúcares reductores liberados en los bioplásticos depende de la concentración de almidón presente en los materiales y de la disponibilidad de dicho carbohidrato ya que durante la extrusión se produce despolimerización del almidón y formación de cadenas lineales, con alta tendencia a formar estructuras que presentan baja digestibilidad enzimática (Lehmann, 2002).

Expresión e identificación del DFA

La inducción para la expresión del DFA se realizó a una DO_{600nm} de 0.6 con IPTG a una concentración 0.4 mM y se tomaron muestras a las 0, 2, 4 y 14 horas. Se realizó un Western-Blot para su identificación aprovechando el reconocimiento del anticuerpo anti-His hacia el tallo de histidinas fusionado al DFA. En la Figura 16 se observa que a las 14 horas después de la inducción se presentan bandas de menor peso molecular, que pueden ser producto de la degradación de la proteína, a las 2 horas no se observa degradación del dominio y este se observa como una banda intensa.

De acuerdo con estos resultados las condiciones que se establecieron para la expresión del DFA_{tag} en *E. coli* L10 blue fueron 2 h de inducción con IPTG a una concentración de 0.4 mM que se añaden al cultivo a una DO_{600nm} de 0.6 .

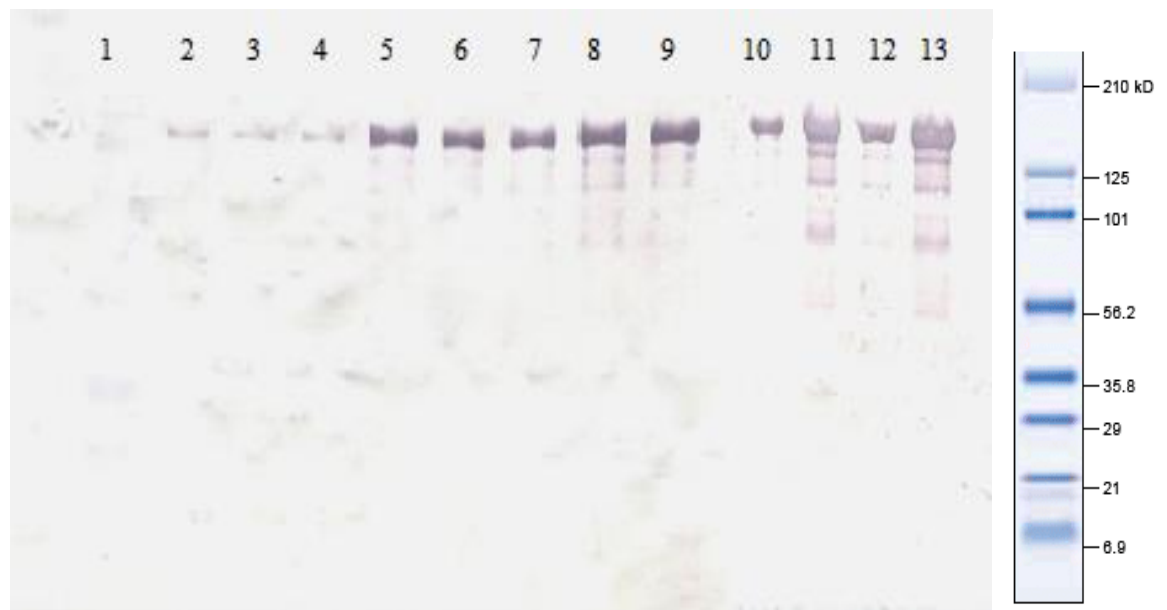


Figura 16. Western Blot para verificar la expresión de DFA (5UR) en *E. coli* XL1 blue pQE31-5UR. Carril 1: marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE estándar Broad Range (BIO-RAD), carril 2, 3,4: células sin inducir, carril 5, 6,7: células inducidas 2h, carril 8, 9,10: células inducidas 4h, carril 11, 12,13: células inducidas 14 h

Prueba cualitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos

Para realizar la prueba cualitativa de adsorción, se indujo la expresión del DFA a las condiciones óptimas establecidas. Las células inducidas fueron centrifugadas, recolectadas, para su posterior lisis para obtener el extracto celular. Después de la incubación del almidón y los bioplásticos con el extracto celular con y sin maltosa, la proteína se eluyó con β -ciclodextrina.

E. coli puede presentar una proteína de unión a maltosa (MBP por sus siglas en inglés) que está implicada en el transporte de maltosa y maltodextrinas a través de la membrana bacteriana, debido a esto se decidió realizar un ensayo con la adición de maltosa, para evitar la posible unión de la MBP al almidón y los bioplásticos.

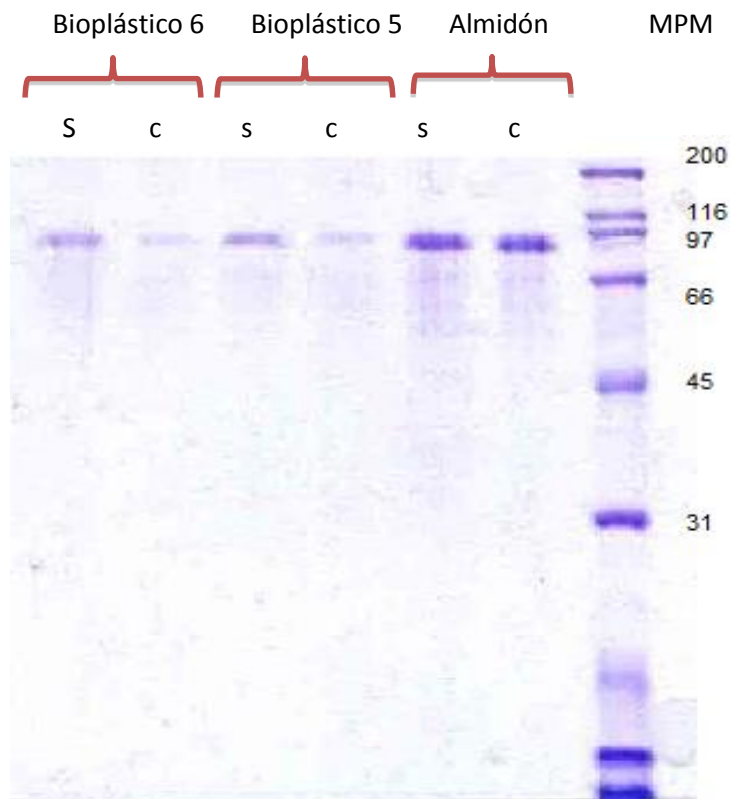


Figura 17. Eluciones de la proteína adsorbida a almidón y bioplásticos. MPM: marcador de peso molecular Broad Range (BIO-RAD), S: ensayo realizado sin maltosa, C: ensayo realizado con maltosa.

Las muestras de la proteína eluida se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (Figura17). Las bandas de la proteína adsorbida a almidón insoluble, con y sin maltosa se observan con una intensidad semejante. En el caso de los bioplásticos se observa que la proteína fue capaz de unirse, pero las bandas de la proteína eluída en presencia de maltosa se observan de menor intensidad que la proteína eluída sin maltosa. Esto sugiere que el almidón en los bioplásticos está presente en poca cantidad o su disponibilidad para lograr la unión de la proteína es baja y por lo tanto cierta cantidad de proteína se une a la maltosa.

Prueba Cuantitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos

El tallo de histidinas al cual esta fusionado el DFA le confiere a la proteína afinidad por ciertos iones metálicos bivalentes como el Ni^{2+} , permitiendo su purificación a través de una columna de sefarosa níquelada. Por lo tanto se hizo pasar el extracto celular obtenido de la lisis por sonicación por una columna de sefarosa níquelada. La proteína unida se eluyó y se recolectó en fracciones de 1 ml. Se analizó su pureza en un gel de poliacrialamida SDS-PAGE al 10% (Figura 18).

Como se puede observar en la Tabla 3, hay una mayor cantidad de proteína adsorbida al bioplástico 5, aproximadamente la adsorción es 2 veces mayor que al bioplástico 6. La cantidad de proteína adsorbida de nuevo depende de la cantidad de almidón y la disponibilidad de este carbohidrato presente en los bioplásticos. Con respecto al BSA no se observó adsorción alguna, eliminando la posibilidad de que los bioplásticos puedan adsorber proteína de manera no específica.

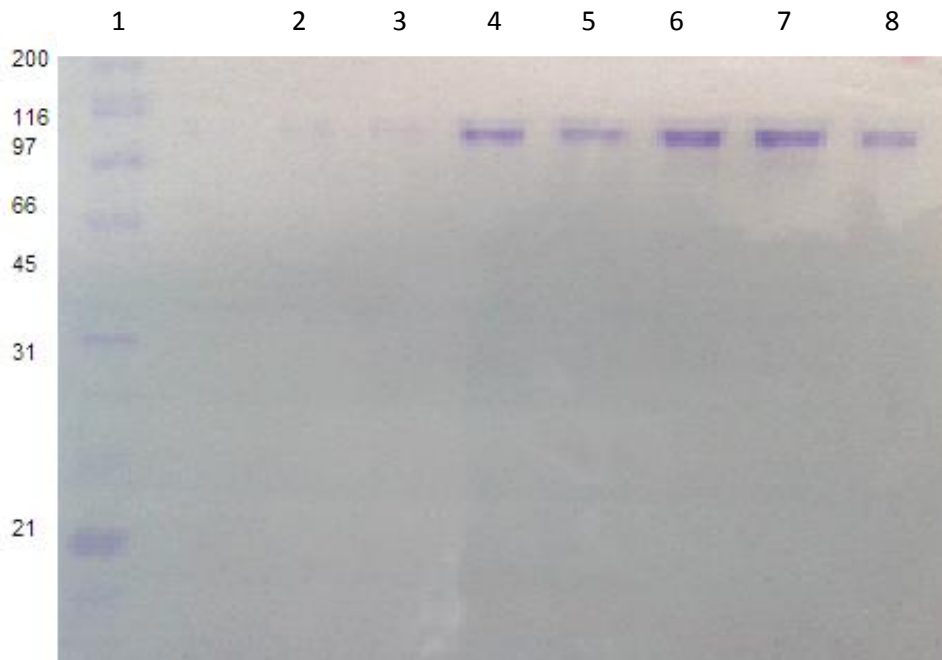


Figura 18. Análisis del ensayo de purificación del DFA en gel SDS-PAGE al 10% carril 1: marcador de peso molecular Range (BIO-RAD), carril 2-9: fracciones obtenidas en la purificación.

Tabla 3. Resultados de la adsorción del DFA a los Bioplásticos

		Concentración de proteína adsorbida (mg proteína/mg de bioplástico)	Porcentaje de proteína adsorbida
DFA	Bioplástico 5	0.050	41.59%
	Bioplástico 6	0.026	21.68%
BSA	Bioplástico 5	-0.005	-
	Bioplástico 6	-0.003	-

Ensayo de fluorescencia

Una manera de visualizar la adsorción del DFA a los bioplásticos es utilizando la fusión de este dominio con una proteína fluorescente como la GFP de *Renilla reniformis* (GFP-DFA). Por otro lado este ensayo también nos puede indicar si el DFA es aún capaz de adsorberse a los bioplásticos teniendo una proteína fusionada como lo hace sobre los gránulos de almidón.

Se realizó el ensayo de expresión de la proteína DFA-GFP a diferentes tiempos utilizando como inductor IPTG a una concentración 0.4 M. En el Western Blot (Figura 19) se puede observar que la proteína de interés se degrada desde las primeras horas de inducción, y aumenta conforme aumenta el tiempo. Se decidió tomar la condición de 6 horas para la inducción de la proteína debido a que a este tiempo la proteína presenta una degradación menor y la expresión es semejante que a 8h.

Las células inducidas se lisaron por sonicación para obtener el extracto celular el cual se incubó por dos horas con 2 mg de bioplásticos y 5 mg de almidón insoluble, se lavaron y se observó en el microscopio de fluorescencia. Como control se utilizó *E. coli* XL-10 Gold expresando solo a la GFP.

El cromóforo de la GFP posee un pico de excitación a 500nm y uno de emisión a 506 nm, cuando la luz UV o luz azul impacta sobre el cromóforo, este toma energía de la luz y se excita, en la fase siguiente, el cromóforo se libera de la energía emitiendo luz en longitud de onda verde. (Tsien, 1998).

El DFA fusionado a la GFP es capaz de conservar la capacidad de unión al almidón, esto se comprobó tras incubar dicha proteína con gránulos de almidón observándose a estos fluorescer (Figura 20).

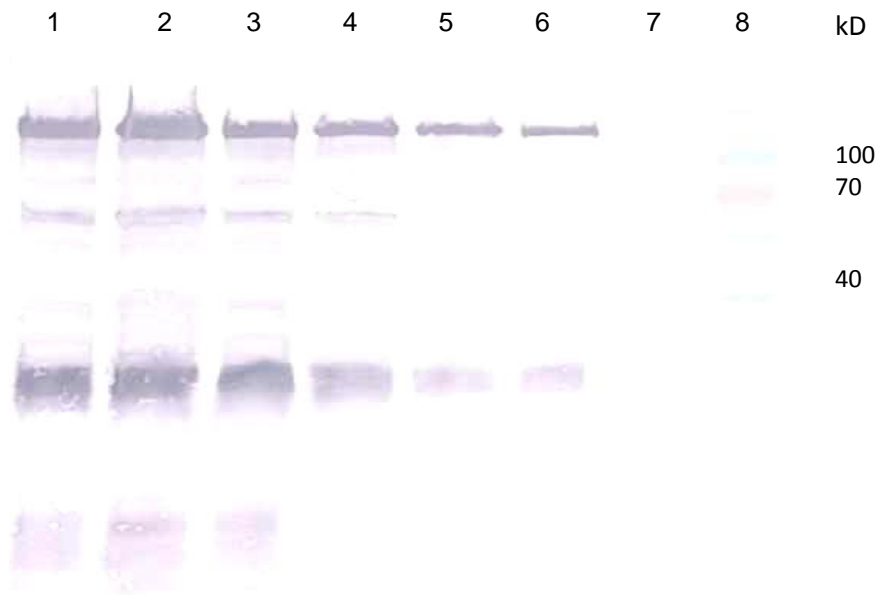


Figura 19. Western Blot para verificar la expresión de GFP-DFA (5UR) en *E. coli* XL-10 Gold. Carril 1: células inducidas 12h, carril 2: células inducidas 10h, carril 3: células inducidas 8h, carril 4: células inducidas 6h, carril 5: células inducidas 4 h , carril 6: células inducidas 2h, carril 7: células sin inducir, carril 8: marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE standards Broad Range (BIO-RAD).

El bioplástico 6 fluoresció después de la incubación con el lisado celular donde se expresó la fusión DFA-GFP (Figura 21 y 22), por otro lado no se observó fluorescencia con las células que expresaron la proteína GFP. Esto indica que hay unión específica entre el bioplástico y el DFA aun estando fusionado con otra proteína. Sin embargo el bioplástico 5 no presentó fluorescencia, a pesar de que en la prueba cuantitativa mostro que el DFA si fue capaz de unirse al bioplástico. Posiblemente la unión proteína-bioplástico es débil provocando la perdida en los lavados, o el almidón presente en el bioplástico está muy disperso y como consecuencia la proteína unida no se logra observar.

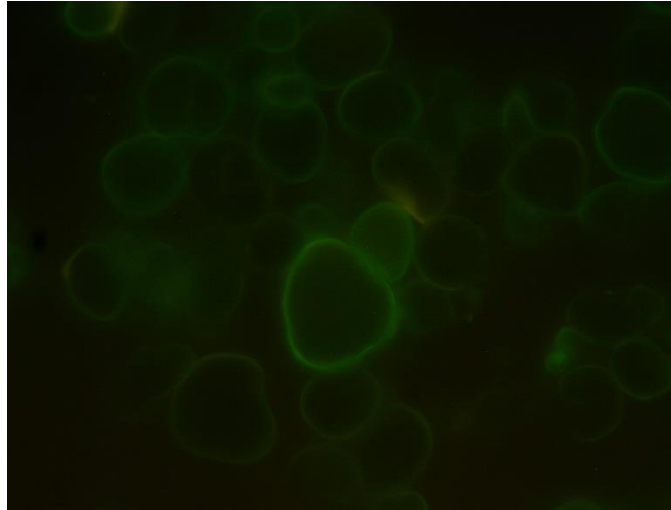


Figura 20 . Imagen a 100x de gránulos de almidón fluorescentes después de ser incubados con lisado de *E.coli* que contiene la proteína de fusión GFP-DFA.

Cuando se realizan fusiones de proteínas, pueden presentarse cambios estructurales radicales provocando cambios en las propiedades que estas poseen, hablando del caso específico la propiedad de unión del DFA al almidón. Sin embargo se obtuvo una adsorción eficiente al bioplástico 6 del DFA aun con una proteína como la GFP fusionada, lo cual da la pauta a la utilización de este dominio para la inmovilización de proteínas, y en caso particular de la investigación en desarrollo de una proteína antimicrobiana.

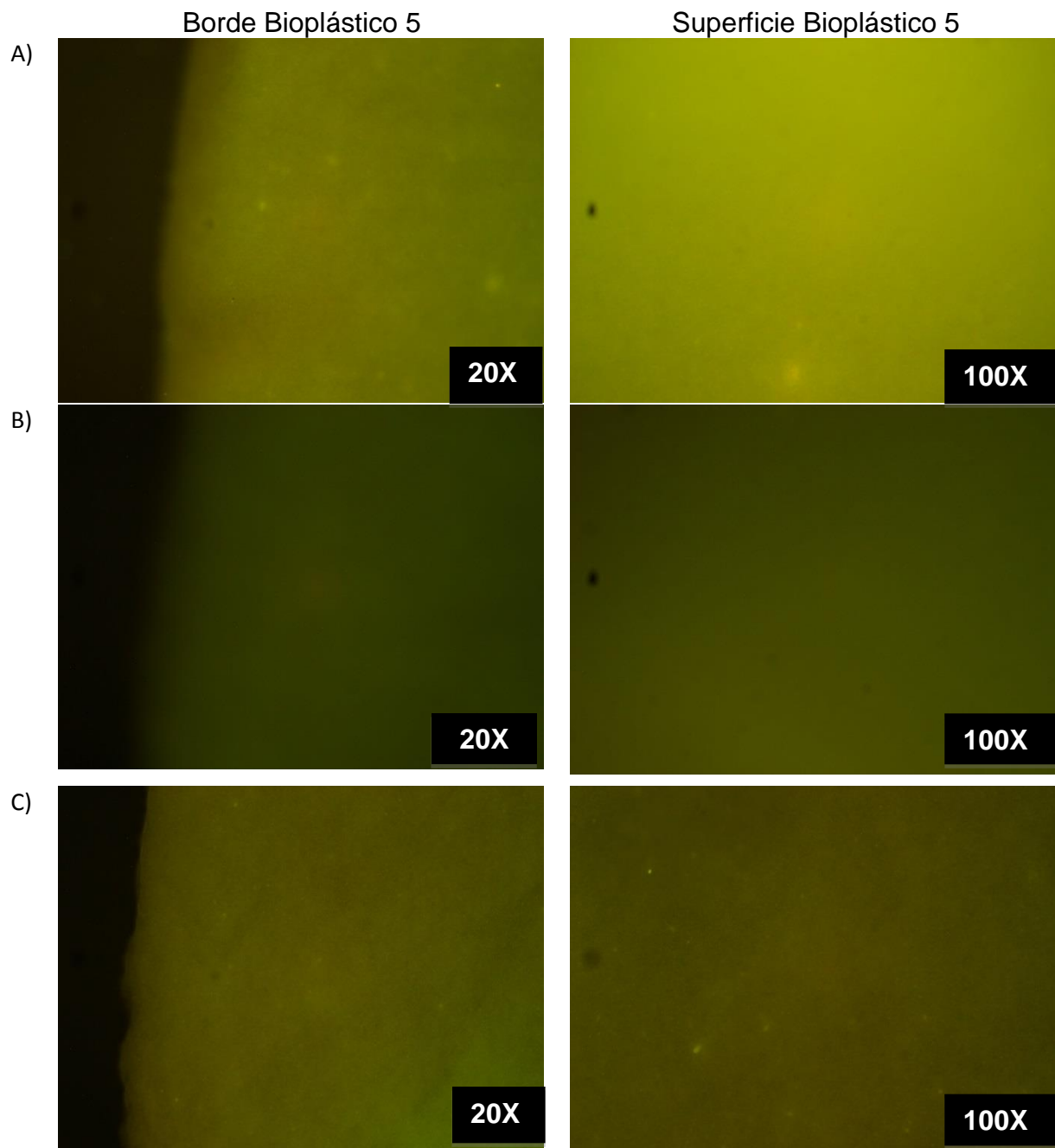


Figura 21. Micrografía del borde y la superficie del bioplástico 5 incubados con A) lisado *E. coli* XL10- Gold GFP-DFA, B) lisado *E.coli* XL10- Gold GFP y C) lisado *E. coli* XL1- Blue DFA.

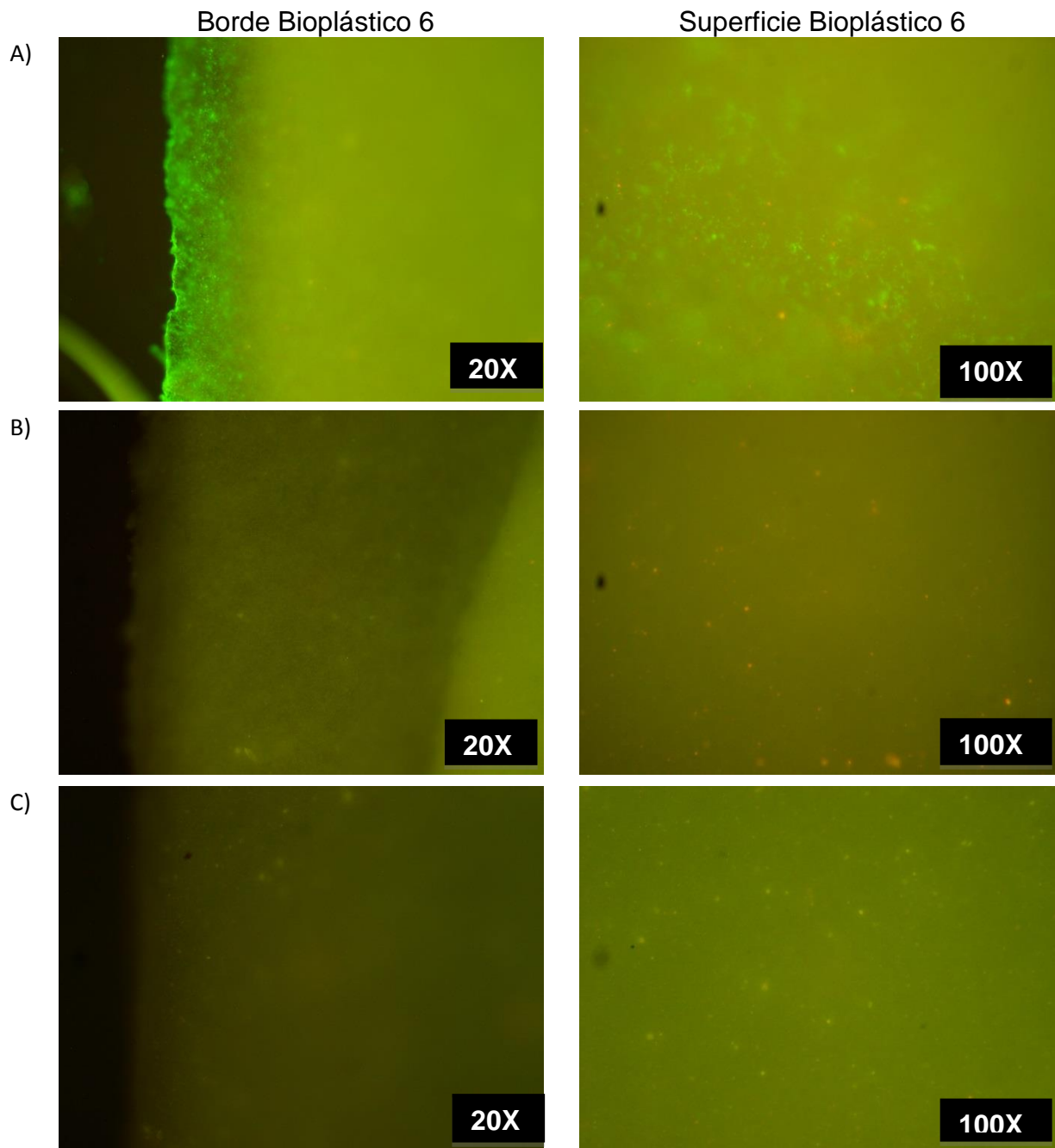


Figura 22. Micrografía del borde y la superficie del bioplástico 6 incubados con A) lisado *E. coli* XL10- Gold GFP-DFA, B) lisado *E.coli* XL10- Gold GFP y C) lisado *E. coli* XL1-Blue DFA

8. Conclusiones

Los biopolímeros 1, 2 ,3 y 4 sufren desintegración, por lo tanto no son útiles como material de empaque.

De acuerdo con la prueba de yodo-yoduro se confirmó la presencia de almidón en los bioplásticos 5 y 6.

En la prueba cualitativa se logró observar la unión específica del DFA a los bioplásticos 5 y 6, la cual posteriormente se confirmó en la prueba cuantitativa.

En el ensayo de fluorescencia un con la fusión de la GFP al DFA este fue capaz de unirse de manera específica al bioplástico 6, siendo este un candidato para el desarrollo del empaque antimicrobiano.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos realizados, el bioplástico 6 es el mejor candidato para realizar las próximas investigaciones para la elaboración de un empaque antimicrobiano

9. Referencias

- Abe A., Tonazuka T., Sakano Y., Kamitori S., (2004). Complex structures of *Thermoacinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *Journal of Molecular Biology*. 335: 811-822.
- Acosta H., Villada H., Torres S., Ramírez J., (2006). Morfología superficial de almidones termoplásticos agro de yuca y nativo de papa por microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica. *Información Tecnológica*. 17: 63-70.
- Appendini P., Hotchkiss J., (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 3: 113-116.
- Asgher M., Javaid M., Rahman S., Leeger R., (2006). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.
- Ashikari T., Nakamura N., Tanaka Y., Kiuchi N., Shibano Y., Tanaka T., Amachi T., Yoshizumi H., (1986). *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 957-964.
- Blasek J., Salman H., Lopez A., Gilbert E., Hanley T., (2009). Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content. *Carbohydrate Polymers*, 75: 701-705.
- Bolam D., Ciruela A., McQueen-Mason S., Simpson P., Williamson M., Rixon J., Boraston A., Hazlewood G., Gilbert H., (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal*. 331: 775-781.
- Boraston A., Healey M., Kñassen J., Ficko-Blean E., Law V., Lammerts A., (2006). A Structural and functional analysis of α -Glucan recognition by family 25 and 26 Carbohydrate-binding Modules reveals a conserved mode of starch recognition. *Chemistry*. 281: 587-598.
- Buléon A., Colonna V., Ball S., (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 85 - 112.
- Cameron R., Donald A., (1992). A small angle X-ray scattering study of the annealing and gelatinization of starch. *Polymer*, 33: 2628-2635.
- Cantarel B., Coutinho P., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B., (2009) The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 37: 233-238.

Carbohydrate Active Enzymes: <http://www.cazy.org>

Dijkhuizen L., Penninga D., Rozeboom H., Strokopytov B., and Dijkstra B., (1995): Protein engineering of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *Progress in Biotechnology*, 10: 165-174.

Donald A., Kato K., Perry P., and Waigh, T., (2001). Scattering studies of the internal structure of starch granules. *Strach*, 53: 504-512.

Gašperík J., Hostinová E., Ševčík J., (2005). Acarbose binding at the surface of *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase suggests the presence of a raw starch-binding site. *Biologia*, 16:167-170.

Giraud E., Cuny G., (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3 end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene*, 198:149-157.

Glaring, M. A., Baumann, M. J., Hachem, M. A., Nakai, H., Nakai, N., Santelia, D., Sigurskjold, B. W., Zeeman, S. C., Blennow, A. and Svensson, B. (2011), Starch-binding domains in the CBM45 family – low-affinity domains from glucan, water dikinase and α -amylase involved in plastidial starch metabolism. *FEBS Journal*, 278: 1175–1185.

Guillen D., Sanchez S., Rodriguez-Sanoja R, (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbial Biotechnol.* 85: 1241-1249.

Gillen D., Moreno-Mendieta S., Aguilera P., Sanchez S., Farrés A., Rodriguez –Sanoja R., (2013), The Starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 4141-4148.

Guillen D., Moreno-Mendieta S., Pérez R., Espitia C., Sánchez S., Rodríguez -Sanoja R., (2014). Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydrate Polymers*, 112: 210-215.

Gross R., Kalra B., (2002). Biodegradable polymers for environment, *Science*, 297: 803-807.

Hancock R., Tarbet B., (2000). The Other Double Helix-The Fascinating Chemistry of Starch. *Journal of Chemical Education* 77: 988-992.

Hizukuri S., (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectin and its significance. *Carbohydrate Research*, 147: 342–347.

Janeček S., Sevcik J., (1999). The evolution of starch-binding domain. *FEBS Letters* 456: 119-125.

Jenkins P., Cameron R., Donald A, (1993). A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch*, 45: 417-420.

Ji Q, Oomen R., Vincken J., Bolam D., Gilbert H., Suurs C., Visser R., (2004). Reduction of starch granule size by expression of an engineered tandem starch-binding domain in potato plants. *Plant Biotechnology Journal*. 2:251-260.

Jore J., de Parasis J., (1999), Studies on the α - amylase of *Lactobacillus amylovorus* as a model for heterologous protein secretion by lactobacilli. *FEMS Microbiol . Rev.* 12:26.

Lehmann U., Jacobasch G., Schmiedl D. (2002). Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.50: 5236-5240.

Leja K., Lewandowics G., (2010). Polymer Biodegradation and Biodegradable. Polymers— a Review. *Polish Journal of Environmental Studies*. 19:255-266.

MacGregor E., Janeček S., Svensson B., (2006). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1546:1-20.

Mikami B., Adachi M., Kage T., Sarikaya E., Nanmori T., Shinke R., Utsumi, S., (1999). Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* α -amylase complexed with maltose. *Biochemistry*, 38: 7050–7061.

Morlon R., Ruiz J., Sánchez B., Rodríguez-Sanoja R. (2007), Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly Arranged Domain. *Applied and Environmental Microbiology* . 73: 3834-3837

Nagy T , Simpson P. Williamson P., Hazlewood G., Gilbert H., Orosz L. (1998). All three surface tryptophans in type II cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Letters*, 429: 312-316.

Plastic Europe Association of Plastics Manufactures: <http://www.plasticseurope.es/>

Rahmat A., Rahman W., Sin L., Yussuf A., (2009). Approaches to improve compatibility of starch filled polymer system: A review. *Materials Science and Engineering*, 29:2370-2377.

Rodríguez-Sanoja R., Morlon-Guyot J., Jore J., Pintado J., Juge N., Guyot J., (2000) Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3350-3356.

Rodríguez-Sanoja R., Ruiz B., Guyot J., Sanchez S.,(2005). Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus* α -Amylases. *Applied and environmental Microbiology*, 71:297-302.

Salcedo J., Montes E., Pajardo J., (2009). Producción de jarabes de fructuosa por medio de la hidrólisis enzimática de almidón de yuca de las variedades Corpoica M Tai-8 y Corpoica Orense. *Dyna* 76:121-130.

Santiago M., Linares L., Sanchez S., Rodriguez R., (2005), Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase. *Biología*, 16:111-114.

Schoter J., Hobelsberger M., (1992) On the Mechanical Properties of Native Starch Granules. *Starch-Starke* 44:247-253. Fishman M, Coffin D, Onwulata C, Willett J (2006) Two stage extrusion of plasticized pectin/poly(vinyl alcohol) blends. *Carbohydrate Polymers* 65:421–429

Siracusa V, Rocculi P, Romani S., Rosa M, (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Science & Technology*. 19: 634-643.

Sorimachi K., Jacks A., Le Gal-Coeffet M., Williamson G., Archer D., Williamson M., (1996) Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 259: 970–987.

Tharanathan, R. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Critical Review in Food Science and Technology*, 14: 71-78.

Tibbot B., Wong D., Robertson G., (2002). Studies on the C-terminal region of barley α -amylase 1 with emphasis on raw starch. *Biología*, 11: 229-238.

Tsien R.,(1998).The green fluorescent protein.*Annu. Rev. Biochemistry*. 67: 509-544.

van der Marel M., van der Veen B., Uitdehaag J., Leemhuis H., Dijkhuizen L., (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.

Van Hijum, Kralj S., Ozimek L., Dijkhuizen L., van Geel-Shuntten I., (2006). Structure-function relationship of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:157-176

Villada H., Acosta H., Velasco R., (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12: 5-13.

Yoshizumi H., Ashikari T., (1987). Expression, glycosylation and secretion of fungal hydrolases in yeast. *Trends in Biotechnology*, 5: 227-281

Zhang B., Li X., Liu J., Xie F., Chen L.,(2012). Supramolecular structure of A and B-type granules of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 31:68–73.

10. Apéndices

Medios de cultivo.

I.A Medio Luria-Bertani.

Componente	[Concentración]
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Nacl	10 g/L

I.B. Médio MRS almidón 1%

Componente	[Concentración]
Peptona pancreatica	10 g/L
Extracto de carne	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Citrato de amonio dibasico	2.17 g/L
CH ₃ COONa-3H ₂ O	5 g/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.207 g/L
MnSO ₄ -H ₂ O	0.056 g/L
K ₂ HPO ₄	2.62 g/L
Almidón soluble DIFCO	10 g/L

Técnicas utilizadas

II.A Géles SDS-PAGE.

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. En la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel; el tamaño de los poros disminuye con altas concentraciones de acrilamida. La combinación del tamaño del poro del gel y la carga de la proteína, tamaño y forma determinan su migración. SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS está cargado negativamente. En este sistema las proteínas tienen carga negativa lo que hace

que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema.

Preparación del gel

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, se marcan los niveles de separación de los geles y se comprueba de que no haya fugas.
2. Se prepara el gel de separación de acrilamida y se coloca dentro de las placas, aproximadamente abarcando 5 cm de altura.
3. Para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.
4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vacía en las placas el gel de concentración, evitando que se formen burbujas dentro las separaciones y entre un gel y otro. Después de la polimerización, los geles están listos para la electroforesis.
6. Se precorre el gel por 10 minutos a 20 mA, por gel, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

Condiciones de migración para 2 geles de acrilamida

Los geles se corren a 40 mA, durante 1.5 h, en una cámara de electroforesis para proteínas (BIO-RAD) con tampón de migración 1X.

Tampón de muestra 4x:

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

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH

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

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

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

II.B Western Blot

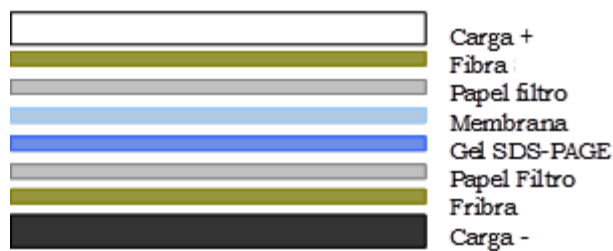
En el western-blot las proteínas son transferidas a una membrana a partir de un gel de acrilamida (SDS-PAGE) después de su separación según su tamaño. La inmunolocalización con anti-His permite asegurar la identidad de la proteína expresada con un tallo de histidinas y confirmar su talla por la comparación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

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100mL del buffer 10x + 100mL de metanol y se afora a 1 L.

2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol puro, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con tampón de transferencia.

3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma:



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

5. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque del aparato de Western, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.

6. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.

7. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3h, 1 h a 37°C y se puede guardar durante algunos días.

Reconocimiento con Anti-His

1. En caso de que no se cuente con marcador de peso molecular con tallo de histidina se sumerge la membrana en metanol para observar las proteínas transferidas, recortando la región donde se encuentra el marcador de peso molecular para ser revelado con azul de bromofenol u otra técnica similar.

2. Se prepara el tampón donde se sumergirá la membrana el cual debe tener los siguientes componentes: Tampón PBS 1x, Tween 20 0.05% y Leche descremada 3%.
3. El primer anticuerpo (anti-His) se diluye en el buffer anterior a una concentración final de 0.2 µg/mL y se agrega la cantidad necesaria para cubrir la superficie de la membrana. Se incuba a 15-20°C 1-1.5h con agitación ligera.
4. La membrana se lava por 5 min con 20 mL de tampón PBS 1x/Tween 0.05% 3 veces.
5. Se prepara el segundo anticuerpo (anti-IgG) de la misma forma que el primero, quedando a una concentración final 0.2 µg/mL, se incuba y se lava de igual manera.

Revelado

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

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

II.C Purificación α -amilasa

1. *L. amylovorus* se preinoculó al 1% en un volumen de 10 ml de medio MRS con almidón al 1%, se incubó a una temperatura de 29 °C durante 24 horas, seguida de la incubación, se inoculó un litro de medio MRS con almidón al 1% durante 16 horas .
2. Se centrifugo el medio a 800 rpm durante 15 minutos, y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45 μ m y se le agregó inhibidor de proteasas (1/500).
3. El sobrenadante se pasó por una columna de sefarosa acoplada a β -ciclodextrina a un flujo de 1ml/min. Se lavó la muestra que se unió a la resina con buffer citrato-fosfatos pH=5 0.1M. Después de lavar la resina, la proteína adsorbida a la columna se eluyó con buffer citrato-fosfatos pH=5 0.1 M con β -ciclodextrina (9mg/ml) La α -amilasa se recuperó en fracciones de 0.75 ml

II.D Ensayo para determinar la liberación de azúcares reductores en los bioplásticos.

Reactivo DNS

1. Preparar una solución de almidón soluble ProLabo y de almidón insoluble SIGMA a una concentración de 12.5 mg/ml en buffer citrato fosfatos 0.1M pH=5.

Las muestras se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla D1. Cantidades utilizadas para la preparación de muestras

Almidón soluble -40 μ l de almidón soluble -5 μ l de una dilución 1/100 de α -amilasa -205 μ l de agua	Bioplásticos -2mg de bioplástico -5 μ l de α -amilasa purificada -225 μ l de agua	Almidón insoluble -40 μ l de almidón soluble -5 μ l de α -amilasa purificada para almidón insoluble. -205 μ l de agua
--	---	---

*Los blancos se prepararon igual que las muestras.

2. Las muestras se incuban a 63°C por 10 minutos y los blancos se mantienen en hielo.

3. Se les agrega 250 µl de reactivo DNS y se hierven por 10 minutos, se enfrían a temperatura ambiente y se llevan a un volumen final de 2.5 ml. Leer a 550nm.

Construcción de la curva patrón DNS

1. Preparar una solución de glucosa a una concentración de 1 mg/ml

2. Realizar la curva patrón de la siguiente forma.

Tabla D2. Datos para la construcción de la curva patrón

Concentración glucosa (mg/ml)	Agua (ml)	Solución glucosa (ml)	Reactivo DNS (ml)
0	0.5	0.5	0.5
0.2	0.4	0.4	0.5
0.4	0.3	0.3	0.5
0.6	0.2	0.3	0.5
0.8	0.1	0.4	0.5
1	0	0.5	0.5

3. Hervir la curva 10 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 1.5 ml de agua y leer a 550 nm.

II.E Lisis celular por sonicación

1. A partir de un preinoculó, se inocula al 1% un matraz con 250 ml de medio LB con ampicilina a una concentración 100 µg/ml. Incubar a 29°C con agitación y entonces inducir la producción de la proteína a las condiciones óptimas establecidas. Se centrifuga el medio por 10 min a 8000 rpm y descartamos el sobrenadante y se lava el pellet con buffer citrato fosfatos 0.1 M pH=5.

2. Resuspender el pellet en 1 ml de buffer de lisis. Se realiza el proceso de sonicación utilizando 3 impulsos de 10 segundos con 1 minuto de reposo entre cada pulso, con una amplitud de onda de 60 Hz. Todo el proceso se realiza en hielo. Se centrifuga por 10 minutos a 8000 rpm a 4 °C.

3. Recuperar el sobrenadante y mantener en hielo. El pellet celular se resuspende en 1 ml de buffer para lisar, en hielo nuevamente sonicamos 3 impulsos de 20 segundos con 1 minuto de reposo entre cada impulso.

4. Se mezclan los sobrenadantes y se añade tritón al 20% para obtener una concentración final de 1%. Llevar a un volumen final de 2.5ml. Dejar en agitación suave durante 1 hora.

II.F Prueba Cualitativa de adsorción del DFA a los bioplásticos

1. Se pesaron 100 mg de almidón Sigma-Aldrich y se lavaron 3 veces con agua destilada (se vortexea hasta resuspender el pellet y se centrifugó por 3 min a 1300 rpm). Se le agrega 1 ml de buffer citrato fosfatos 0.1M pH=5. Se preparo una solución stock de almidón 100 mg/ml.

2. Se tomó un 1 ml de lisado y se le agregaron 20µl de maltosa 0.5 M, para obtener una concentración final de 20 mM. El resto del lisado y el lisado con maltosa se filtran por una membrana de 0.8 µm y después por una de 0.45 µm.

3. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de lisado, almidón y bioplásticos utilizados en el ensayo.

Tabla F1. Cantidades de lisado, almidón y bioplástico utilizada en el ensayo

Tubo		Lisado con maltosa (µl)	Lisado con maltosa 20 mM (µl)
1	Almidón 10 µl de la solución almidón 100 mg/ml	300	
2	Bioplástico 5 2 mg	300	
3	Bioplástico 6 2 mg	300	

4	Almidón 10 µl de la solución almidón 100 mg/ml		300
5	Bioplástico 5 2 mg		300
6	Bioplástico 6 2 mg		300

II.G Purificación DFA

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

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

1. Las células fueron crecidas e inducidas a las condiciones óptimas establecidas, se colectaron por centrifugación y se guardó el botón celular en congelación.
2. Se resuspendió el botón celular en 5 ml de buffer para lisar. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo. En tubos de 15 ml se sonicó a una amplitud de onda de 60Hz dando 3 impulsos de 20 segundos con 1 minuto de reposo entre cada impulso. Y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C.
3. Se rescató el sobrenadante y se mantuvo en hielo, se adicionaron 2 ml de buffer para lisar al pellet celular, se sonicó nuevamente a la misma amplitud de onda dando 3 impulsos de 20 segundos con un minuto de reposo entre cada impulso.
4. Se mezclaron los dos sobrenadantes y se agregó Triton al 20% para obtener una concentración final de 1% y se ajustó el volumen a 10 ml con buffer de lisis. Se centrifugó a 13 00rpm por 25 minutos.
5. Se filtró el sobrenadante por un membrana de 0.8 µm y después en una membrana de 0.4 µm

6. Se preparó una columna de sefarosa His Trap™ HP de 1 ml, la cual tiene fijado níquel (Ni²⁺). Se colocó la columna en el FPLC y se realizó la purificación, la elución de la proteína se realizó con un gradiente de 0 a 100% de buffer fosfatos 20 mM con imidazol 250 mM. Posteriormente se verificó la pureza en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

7. El DFA puro fue dializado en membranas Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 10 000 por 18 horas a 4°C en un buffer de citrato fosfato 0.1M a pH 5.

II.H Cuantificación de proteína por el método de Biuret.

1. Preparar una solución de 1mg/ml de BSA.
2. Realizar la construcción de la curva patrón de acuerdo a la siguiente tabla..

Tabla H1. Construcción de la curva patrón

Solucion BSA 1mg/ml (ml)	Buffer citrato-fosfatos pH=5 (ml)	Reactivo de Biuret (ml)
0	0.5	0.25
0.1	0.4	0.25
0.2	0.3	0.25
0.3	0.2	0.25
0.4	0.1	0.25
0.5	0	0.25

Se toman 100 µl de las muestras y 50 µl del reactivo de Biuret y se lee a 550nm.

II.J Ensayo de fluorescencia

1. A partir de un preinóculo, se inoculó al 1% un matraz con 500 ml de medio LB con ampicilina a una concentración 100 µg/ml. Se incubó a 29°C con agitación y

se indujo la producción de la proteína a las condiciones óptimas establecidas. Se centrifuga el medio por 10 min a 8000 rpm, se lavó el pellet con buffer citrato fosfatos 0.1M a pH=5.

2. Se resuspendió el pellet en 1.5 ml de buffer de lisis con tritón al 1%. Se realizó el proceso de sonicación utilizando 3 impulsos de 10 segundos con 1 minuto de reposo entre cada pulso, con una amplitud de onda de 60 Hz. Todo el proceso se realizó en hielo. Se centrifugó por 10 minutos a 8000 rpm a 4 °C.

3. Recuperar el sobrenadante, y mantener en hielo. El pellet celular se resuspendió en 1.5 ml de buffer para lisar, en hielo nuevamente se sonicó 3 impulsos de 20 segundos con 1 minuto de reposo entre cada impulso. Se centrifugó a 13000 rpm por 25 minutos.

4. Solución stock de almidón 100 mg/ml . Pesar 100mg de almidón Sigma-Aldrich, lavar 3 veces con agua destilada (se mezcla con el vortex hasta resuspender el pellet y se centrifuga por 3 min a 1300 rpm). Se le agrega 1 ml de buffer citrato fosfatos 0.1M a pH=5.

5. Se filtra el sobrenadante por una membrana de 0.8 µm y después por una membrana de 0.4 µm.

Nota: Todo el proceso se realiza protegiendo la proteína de la luz.

Ensayo

1. Para el ensayo de fluorescencia se toman 2 mg de cada bioplástico y 50 µl de la solución stock de almidón (100mg/ml) y se incuban por dos horas con 1.5 ml de lisado celular de *E. coli* XL10 Gold DFA-GFP, *E. coli* XL10 Gold GFP, *E. coli* XLBlue DFA.

2. Después de la incubación se realizó 3 lavados de 1ml con buffer citrato fosfatos 0.1M a pH=5.

3. Las muestras se observarán en un microscopio de Fluorescencia.