



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Purificación y caracterización bioquímica,
estructural y funcional de una amilasa
multifuncional del molusco marino
Megathura crenulata.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C O**

**PRESENTA:
ENRIQUE PRIEGO HERNÁNDEZ**

**TUTORA
Dra. Alejandra Hernández Santoyo**



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



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: Rodríguez Sotres Rogelio

VOCAL: Profesor: Avila Chávez Euclides

SECRETARIO: Profesor: Hernández Santoyo Alejandra

1er. SUPLENTE: Profesor: Morales Flores Félix

2º SUPLENTE: Profesor: Axosco Marín Javier

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma De México

Asesor del tema:

Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Sustentante:

Enrique Priego Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Un especial agradecimiento a la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por permitirme formar parte de su grupo de investigación para el desarrollo del presente proyecto, asimismo sus oportunas enseñanzas y comentarios para el desarrollo de este.

A la Q.F.B Ma. Del Rocío Patiño Maya del Laboratorio de Espectroscopia y Polarimetría del Instituto de Química de la UNAM, por el apoyo técnico con el equipo de dicroísmo circular.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, al Dr. Euclides Avila Chávez y al Dr. Félix Morales Flores por dedicar tiempo a leer y corregir esta tesis para su mejora.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y la Dra. Annia Rodríguez Hernández por su apoyo técnico y académico en todo momento.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo al proyecto IN208318

RESUMEN

Las amilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos presentes en el almidón y glucógeno. Estas glicohidrolasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, sin embargo, a la fecha son muy pocos los estudios sobre amilasas de invertebrados marinos aun cuando estos son una fuente prometedora de estas enzimas. En el presente estudio se estandarizó una metodología de purificación usando perlas de alginato como soporte de afinidad para el aislamiento de una α -amilasa (*McAmy*) del molusco marino *Megathura crenulata*. Se obtuvo un factor de purificación de 47 y una actividad específica de 1.44 U/mg y por espectrometría de masas MALDI-TOF se confirmó la pureza de *McAmy* y se determinó una masa de 18.3 kDa, siendo una de las amilasas más pequeñas reportadas a la fecha.

La caracterización bioquímica de esta enzima mostró que tiene un óptimo de actividad catalítica a 50 °C y pH 6, mantiene el 50 % de su actividad en un intervalo de pH de 5.8 hasta 6.8 y un intervalo de 35 °C hasta 57 °C. Además, *McAmy* es una amilasa calcio independiente, sin embargo, se observó un aumento en la actividad en presencia del ion Ca^{2+} (153 %), así como con Mg^{2+} (121 %). Por otro lado, iones como Cu^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} disminuyeron la actividad a un 40 %, 50 % y 60 %, respectivamente. En presencia de aditivos, la actividad aumentó en presencia de sorbitol (121 %) y DTT (137.2 %). La mezcla con Ca^{2+} y DTT aumentó cooperativamente la actividad específica a un 182 %. En estudios de termoestabilidad, *McAmy* fue estable en el intervalo de 4 °C hasta los 40 °C y se mantuvo el 50 % de su actividad a 50 °C.

Mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) se evidenció que *McAmy* fue bastante estable, ya que se obtuvo una temperatura de fusión mayor a 96 °C, que posteriormente se confirmó con ensayos de DC. Por otro lado, la desconvolución de los espectros de DC mostraron que *McAmy* tuvo el siguiente contenido de estructura secundaria: 0 % de hélices, 44.6 % de hebras β antiparalelas, 13.6 % de giros y 41.8 % de otro contenido de estructura secundaria, lo que rompe el paradigma de que todas las amilasas requieren tener un plegamiento de barril TIM (β / α)₈.

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen.....	4
Abreviaturas.....	7
Introducción.....	9
1 Marco teórico.....	10
1.1 Amilasas: importancia biológica y económica.....	10
1.2 Clasificación de las GH	11
1.3 Endo y exo amilasas	12
1.4 α -amilasas	13
1.5 β -amilasas.....	15
1.6 γ -amilasas.....	17
1.7 Mecanismos de hidrólisis de enlaces glicosídicos.....	19
1.8 Enzimas moonlighting	21
1.9 Organismo de estudio: <i>Megathura crenulata</i>	22
2 Antecedentes.....	23
3 Hipótesis.....	25
4 Objetivos.....	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5 METODOLOGÍA	26
5.1 Material biológico.....	26
5.2 Tratamiento del material biológico	26
5.3 Metodologías de purificación de la α -amilasa del molusco <i>Megathura crenulata</i>	26
5.3.1 Cromatografía de afinidad de agar	26

5.3.2	Cromatografía de afinidad de alginato	27
5.4	Cuantificación de la enzima.....	28
5.5	Espectrometría de masas MALDI-TOF	29
5.6	Ensayos de especificidad.	30
5.7	Determinación de la actividad amilolítica	31
5.8	Hidrólisis de ciclodextrinas	33
5.9	Determinación de parámetros óptimos de la actividad amilolítica de McAmy	34
5.9.1	Efecto de la temperatura	34
5.9.2	Efecto del pH.....	34
5.10	Estabilidad térmica de <i>McAmy</i>	35
5.11	Fluorimetría de barrido diferencial (DSF).....	36
5.12	Estudios de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano.....	39
6	Resultados y discusión.....	42
6.1	Purificación	42
6.2	Ensayos de especificidad	47
6.3	Ensayo comparativo de actividad amilolítica	49
6.4	Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad amilolítica.....	51
6.5	Efecto de las sales amortiguadoras	54
6.6	Ensayos de actividad amilolítica con agentes reductores	55
6.7	Estudio de estabilidad estructural y estabilidad funcional	57
6.8	Efecto de los iones y aditivos en la actividad enzimática	59
6.9	Estudios de dicroísmo circular.....	60
7	Conclusiones.	63
8	Bibliografía.	64

ABREVIATURAS

BCA: Ácido bicinconínico

BLA: α -amilasa de *Bacillus licheniformis*

BSA: Albúmina de suero de bovino

CAZy: Base de datos de enzimas activas en carbohidratos (por sus siglas en ingles Carbohydrate-Active Enzyme)

CBM: Módulos de unión a carbohidratos

cP: centipoise

DC: Dicroísmo circular

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DSF: Fluorometría Diferencial de Barrido (por sus siglas en inglés Differential Scanning Fluorimetry)

DTT: Ditiotreitól

ET: Estado de transición

GH: Glicohidrolasa

kDa: kilo daltones

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

McAmy: α -amilasa de *Megathura crenulata*.

M. crenulata: *Megathura crenulata*

MES: Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

mm: milímetros

mM: milimolar

MMTS: Metanotiosulfonato de S-Metilo

NEM: N-etilmaleimida

nm: nanómetros

p-NPG1: p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido

p-NPG2: p-nitrofenol- α -d-maltósido

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

S_N2: Mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular

TCEP: Tris-(2-carboxietil) fosfina

UV: Ultravioleta

β -ME: β -mercaptoetanol

INTRODUCCIÓN

Las amilasas son enzimas que pertenecen a la familia de las glicohidrolasas (GH) y que actúan sobre los enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos presentes en el almidón y glucógeno. Tienen un rol biológico importante debido a que ayudan a los seres vivos a metabolizar el almidón de sus alimentos, o aprovechar el que ha sido almacenado en su interior, para obtener energía [1], [2]. De acuerdo a similitudes en la estructura terciaria, secuencia de aminoácidos y aspectos evolutivos, las amilasas se encuentran clasificadas en las familias 13, 14, 15, 31, 57, 70 y 77 de las GH [1], [3]. La familia GH13 es conocida como la familia de las α -amilasas. Estructuralmente, consisten en una cadena polipeptídica plegada en tres dominios, donde el dominio A es conocido como el dominio catalítico, que consiste en un barril (β / α)₈ ubicado en el N-terminal [4]. En el dominio B predominan las hebras β , el número de hebras varía considerablemente entre las diferentes α -amilasas, y está implicado en la formación del canal o hendidura para la unión del sustrato [4]. El dominio C tiene un plegamiento del tipo β -sándwich y su función aún sigue en discusión [4], [5]. Estas enzimas son ubicuas en la naturaleza, por lo que pueden ser producida por diversas especies de animales, plantas y microorganismos.

Desde la década de los 60's, el ser humano les confirió un rol económico importante a las amilasas, de tal manera que la hidrólisis enzimática para la degradación del almidón se convirtió en un método industrial líder [6]. Desde entonces, la industria textil, alimentaria, de biocombustibles y de detergentes, han utilizado α -amilasas producidas o expresadas por microorganismos terrestres, ya que demuestran ser la mejor fuente y la más confiable para satisfacer la demanda industrial [4], [7]. A diferencia de sus contrapartes terrestres, las enzimas producidas por organismos marinos son atractivas por sus características bioquímicas y funcionales únicas [8]. Debido a la gran biodiversidad del hábitat marino, los beneficios que podrían aportar las α -amilasas marinas permanecen aún sin explorar, por lo que ofrecen nuevas oportunidades para líneas de investigación diversas y futuras aplicaciones biotecnológicas [8]. Por lo anterior, en el presente estudio se purificó una amilasa del molusco marino *Megathura*

crenulata y se caracterizó bioquímica, funcional y estructuralmente, esto con el fin de aportar información valiosa sobre amilasas de invertebrados marinos.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Amilasas: importancia biológica y económica

El almidón es un polímero de glucosa que es sintetizado por una amplia gama de especies de plantas y algas [4], [9]. Los gránulos de almidón contienen dos tipos de α -glucanos, amilosa y amilopectina, que representan en general el 98-99% de su peso seco total. La amilosa es un polímero lineal de glucosa (insoluble en agua) unido por enlaces α -1, 4 glucosídicos, mientras que la amilopectina es un polisacárido ramificado (soluble en agua) con cadenas lineales cortas de 10 a 60 unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -1, 4 con cadenas laterales de 15 a 45 unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -1, 6. La proporción de los dos polisacáridos depende del origen del almidón, pero los niveles representativos de amilosa a amilopectina son 25-28 y 72-75%, respectivamente [4]. Este polisacárido es muy importante en el ciclo de vida de los organismos, ya que es un polisacárido de almacenamiento de energía y una de las principales fuentes de energía química. Para obtener la energía requerida para sus funciones biológicas, los organismos necesitan de enzimas que les permitan degradar el almidón que ha sido almacenado. Las amilasas son enzimas implicadas en la degradación del almidón, o glucógeno, para producir fragmentos de amilosa, dextrinas y maltosa. Estas enzimas son producidas por una variedad de organismos como bacterias, plantas y animales [10].

A partir de 1960, la hidrólisis enzimática del almidón se volvió el principal método industrial (siendo seguro, energéticamente eficiente, realizable a gran escala y tecnológicamente simple) dejando un espacio muy limitado para la hidrólisis catalizada en condiciones ácidas [6]. En general, las amilasas (principalmente de microorganismos, ya que satisfacen la demanda industrial [11]) han sido utilizadas en la industria del papel, producción de biocombustibles, detergentes y alimentos, entre

otras, de acuerdo a sus propiedades (figura 1). Los productos de hidrólisis del almidón son de gran importancia económica y esto se ha visto reflejado en el crecimiento económico actual que han tenido esas industrias, así como el pronóstico favorable que se tiene para el año 2024, pues se espera que el segmento de biocombustibles sea el área de aplicación de más rápido crecimiento durante el período, con una tasa de crecimiento anual compuesta del 7.3 % aproximadamente. Esto puede deberse a la creciente preocupación que se tiene acerca de las opciones energéticas basadas en combustibles fósiles y en la búsqueda de alternativas más limpias [12].

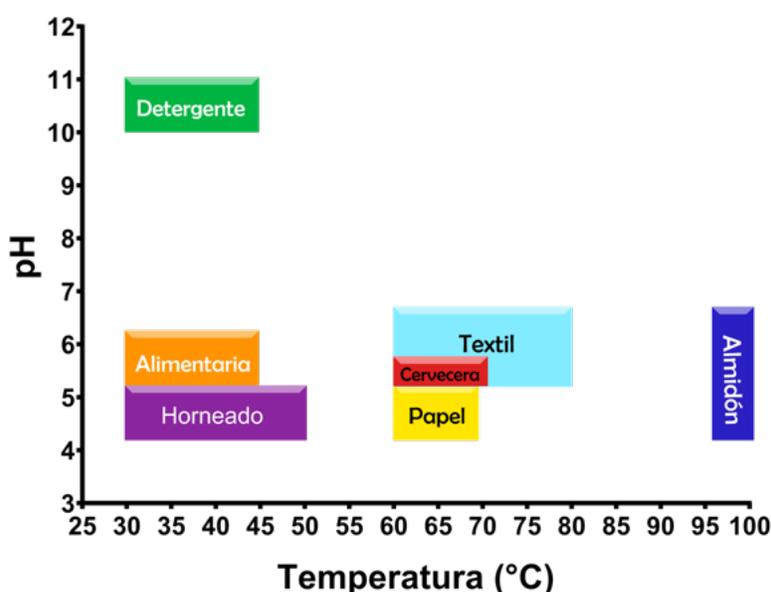


Figura 1. Características importantes de las α -amilasas para diferentes aplicaciones industriales. (Tomado y adaptado de D. Mehta y T. Satyanarayana [4]).

1.2 Clasificación de las GH

En 1991, Bernard Henrissat fue el primero en proponer un sistema para la clasificación de las GH. Su clasificación se basa en la similitud de las secuencias proteicas agrupándolas en familias y cada familia se establece por 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 agrupa a las familias de enzimas que poseen un origen común, como semejanza significativa en su estructura terciaria, conservación de secuencia y mecanismos catalíticos [1], [13].

A la fecha, las GH están agrupadas en 117 familias en la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (Carbohydrate-Active enZymes Database, CAZy; <http://www.cazy.org/>), las enzimas que actúan sobre el almidón se encuentran en las familias 13, 14, 15, 31, 57, 70 y 77. La familia GH13 es conocida como la familia de la α -amilasa y, junto con las familias GH70 y GH77, forma el clan GH-H [3]. Por otro lado, la familia GH14 contiene a las β -amilasas que no se subdividen en clanes y la familia GH15, que pertenece al clan GH-L, incluye a las glucoamilasas.

1.3 Endo y exo amilasas

Según el modo de acción sobre el almidón, las amilasas pueden ser endoactivas o exoactivas. Por ejemplo, las α -amilasas (GH13) son enzimas endoactivas, es decir, que cortan los enlaces glucosídicos α -1, 4 internos del almidón (sin actuar sobre los puntos de ramificación α -1, 6) liberando α -dextrinas en la primera etapa de hidrólisis. A medida que avanza la hidrólisis, el grado de polimerización de las dextrinas disminuye gradualmente. En la etapa final del proceso se produce maltosa, maltotriosa, glucosa y oligosacáridos en configuración α . Los perfiles de composición del producto difieren mucho según el origen de la enzima [5].

Las β -amilasas (GH14) son exoenzimas que hidrolizan los enlace α -1,4 por el extremo no reductor. A diferencia de la α -amilasa, la β -amilasa invierte la configuración anomérica de los productos, generando β -maltosa, β -glucosa y, al no poder hidrolizar los enlaces α -1,6 del sustrato, también se generan β -oligosacáridos [4], [5]. De igual manera, la γ -amilasa (GH15) es una exoenzima que actúa sobre los enlaces α -1,4 y α -1,6 de los α -glucanos por los extremos no reductores. Esta enzima es capaz de producir únicamente β -glucosa. En conjunto, estas enzimas son capaces de hidrolizar el almidón para producir glucosa en un rendimiento teórico del 100% [4].

1.4 α -amilasas

La mayoría de las α -amilasas son metaloenzimas, que requieren de iones de Ca^{2+} para su actividad, integridad estructural y estabilidad [10]. Están influenciadas por la temperatura y el pH del medio, en el caso de este último y de acuerdo con la literatura actual, una amilasa con un pH óptimo de 2.5 a 4.5 se clasifica como una amilasa ácida, mientras que una amilasa neutra generalmente tiene un pH óptimo de 5.0 a 6.5.

La α -amilasa A de *Aspergillus oryzae* (también conocida como Taka amilasa A) fue la primera amilasa de la que se determinó su estructura tridimensional [14]. Las α -amilasas tienen una alta similitud entre ellas, constan de tres dominios A, B y C (figura 2), en donde el A representa el dominio catalítico y se caracteriza por tener una estructura con un plegamiento de barril (β / α)₈, o también conocido como barril tipo TIM, este plegamiento es altamente simétrico que consiste en ocho motivos alternados de hebras β paralelas y hélices α [4]. En el dominio B suelen predominar las hebras β , cuyo número varía entre las diferentes α -amilasas. Se especula que este dominio desempeña un papel en las diferencias de especificidad del sustrato [4]. El sitio catalítico está formado por el canal o hendidura que se forma entre el dominio A y el B. En la mayoría de los casos, la triada catalítica está constituida de dos residuos de Asp y un residuo de Glu. Aunque la mayoría de los residuos catalíticos se encuentran en el barril tipo TIM del dominio A, algunos se encuentran en el dominio B [5], [15]. El dominio C constituye la parte C-terminal de la secuencia y está compuesto de un motivo tipo β sándwich. Los dominios B y C están ubicados en lados opuestos del barril TIM [4].

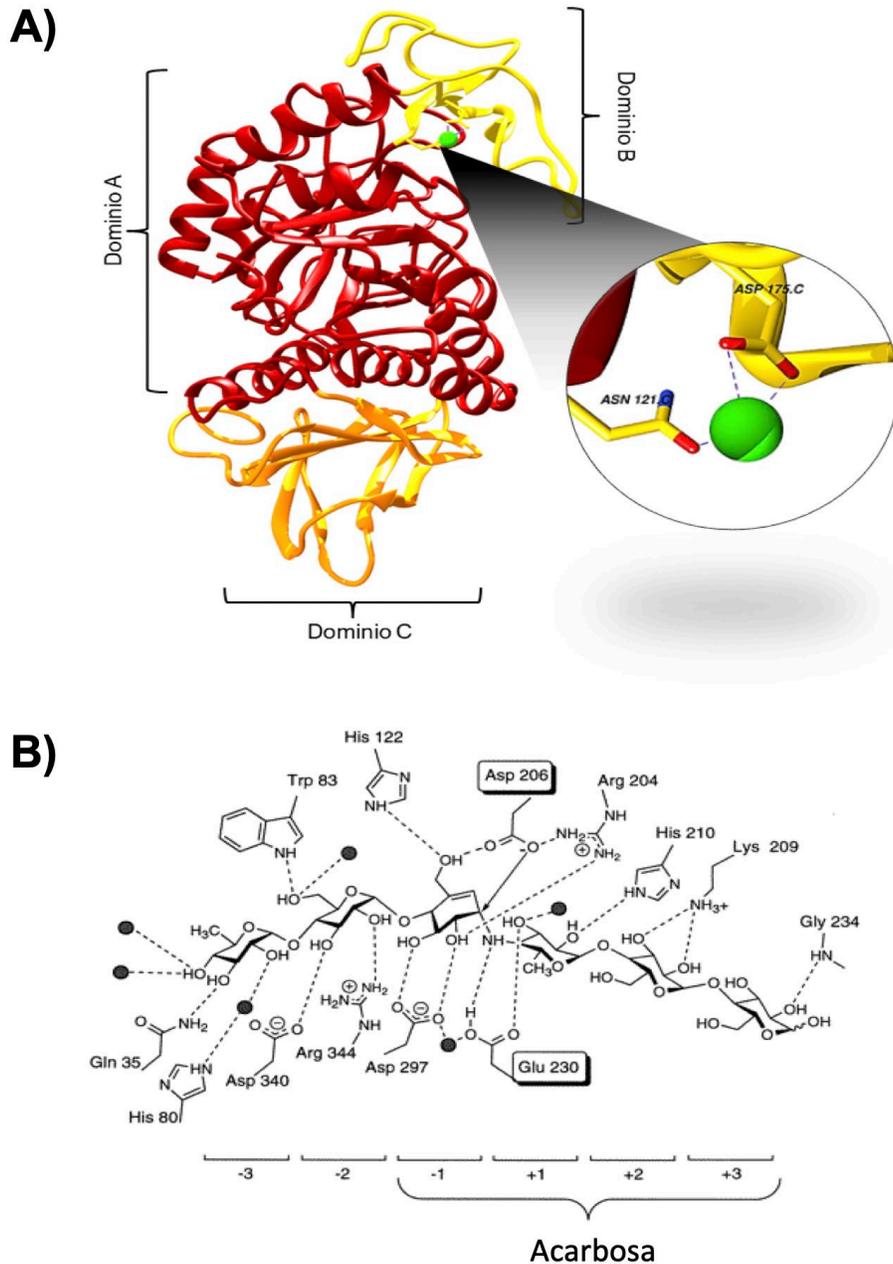


Figura 2. Estructura terciaria de la Taka amilasa A de *Aspergillus oryzae* (PDB: 2TAA). En **A** se observan los tres dominios que constituyen a la α -amilasa, en verde se muestra el ión Ca^{2+} necesario para su actividad. En **B** se observa un diagrama 2D de las interacciones del inhibidor acarbosa con la Taka amilasa, en donde la triada catalítica está formada por los residuos Glu230, Asp206 y Asp297. Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas punteadas y las moléculas de agua como esferas sombreadas.

1.5 β -amilasas

A diferencia de muchas otras enzimas, el término “beta” en este tipo de enzimas no hace referencia al enlace presente en el sustrato, sino a la inversión de la configuración del carbono anomérico que resulta durante la acción de la β -amilasa sobre el almidón [16]. Aun cuando estas enzimas se pueden encontrar ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos, son muy pocas las estructuras cristalográficas que se han obtenido de ellas, tal es el caso de la β -amilasa del camote [17], cebada [18], trigo [19], soya [20] y de *B. cereus* [21]. Estructuralmente presentan alta similitud entre ellas y constan de un sólo dominio catalítico (excepto la β -amilasa de *B. cereus*, que cuenta con un dominio B de 98 aminoácidos). El dominio catalítico tiene el mismo plegamiento (β / α)₈ como las α -amilasas, sin embargo, dos residuos Glu catalizan la reacción de hidrólisis, en el que un Glu actúa como un donador de protones y el otro como un nucleófilo.

El sitio catalítico de la β -amilasa de soya (BAS; figura 3) se encuentra en una estructura similar a un saco de 18 Å de hendidura profunda, y permite la hidrólisis de las cadenas de amilosa y maltosacáridos no ramificadas. Se sabe que dos moléculas de glucosa se unen en tándem en el bolsillo del sitio activo, ocupando los subsitios 1–2 y 3–4, en el que dos residuos catalíticos: Glu 186 y Glu 380, están situados entre los subsitios 3 y 4. Se sabe que el movimiento de abierto-cerrado de una asa flexible (residuos 96-103 en BAS) juega un papel importante en el proceso catalítico. La asa flexible en la posición cerrada ayuda a proteger el centro de reacción del solvente y ayuda a una molécula de agua ordenada adyacente a Glu 380 para proporcionar el resultado estérico de la reacción de hidrólisis. Los residuos de aminoácidos mencionados anteriormente son importantes para la catálisis y la unión del sustrato y están bien conservados entre enzimas vegetales y bacterianas [16].

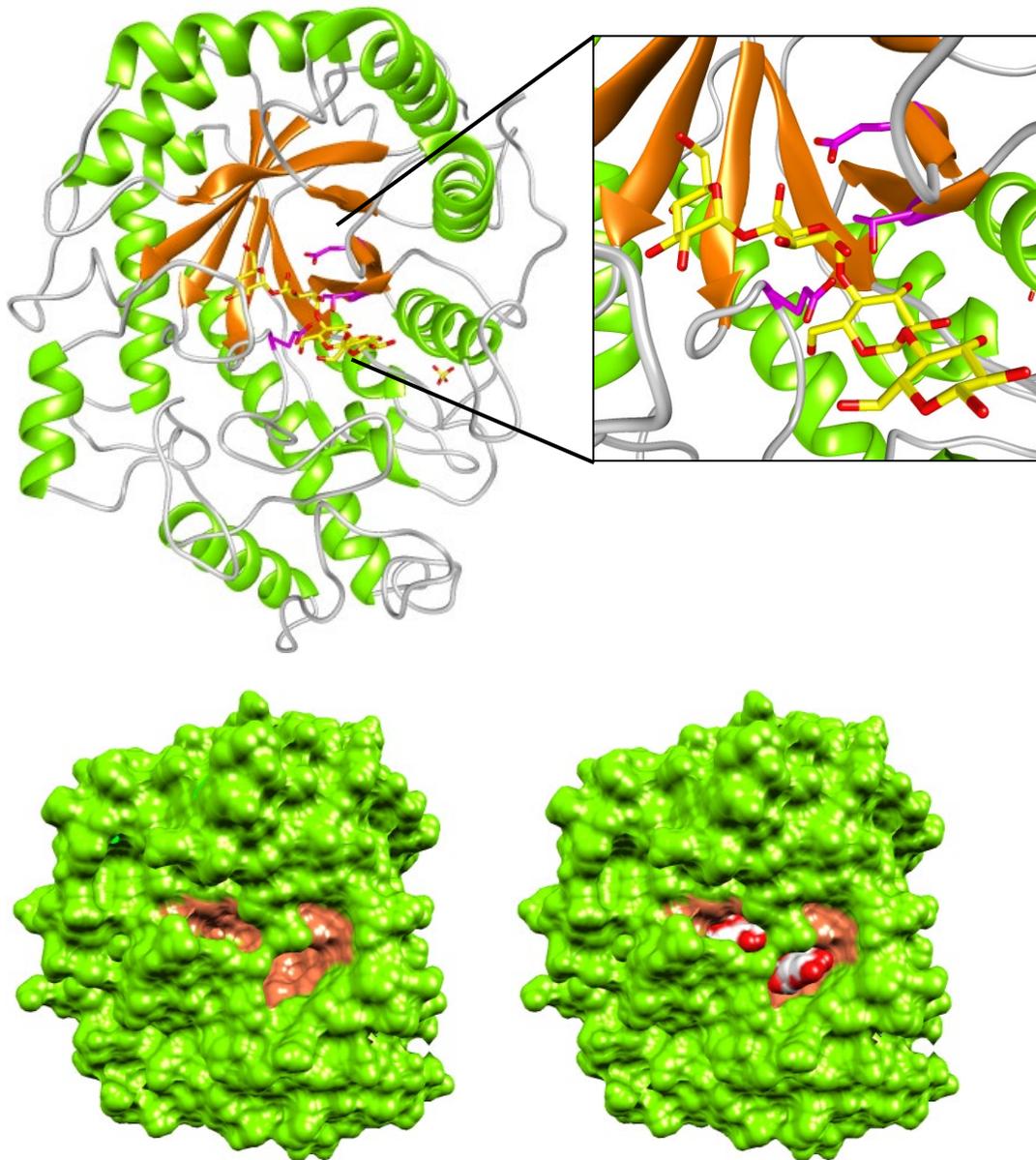


Figura 3. Estructura de la β -amilasa de soja (PDB:1BYC). Arriba se muestra la representación de listones del dominio catalítico con un plegamiento tipo barril TIM, en amarillo se muestra la estructura del ligando maltotetraosa y en rosa se muestran los residuos que forman la triada catalítica. Abajo se muestra la estructura de superficie y se aprecia que el sitio catalítico es similar a un saco, a la izquierda se muestra la apoenzima y a la derecha la holoenzima.

1.6 γ -amilasas

Todas las γ -amilasas (amiloglucosidasas o glucoamilasas) poseen un dominio catalítico común, que puede ser seguido o precedido por dominios adicionales, generalmente módulos de unión a carbohidratos (CBM). El dominio catalítico solo es capaz de degradar oligosacáridos, pero el dominio de unión a carbohidratos es esencial para la interacción y degradación del almidón crudo [22]. La primera estructura cristalina de una glucoamilasa fue el dominio catalítico de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. X100, el cual consta de 13 hélices α , de las cuales 12 forman un barril $(\alpha/\alpha)_6$. En este plegamiento hay seis hélices α externas y seis internas que rodean el sitio activo en forma de embudo en el lado N-terminal. Una estructura cristalográfica posterior, en presencia de acarbosa, permitió la identificación de dos residuos catalíticos conservados de ácido glutámico e interacciones importantes de hasta cuatro subsitios bien definidos. La estructura confirmó que las glucoamilasas emplean un mecanismo de desplazamiento SN2 con inversión de la configuración del carbono anomérico (figura 4) [22].

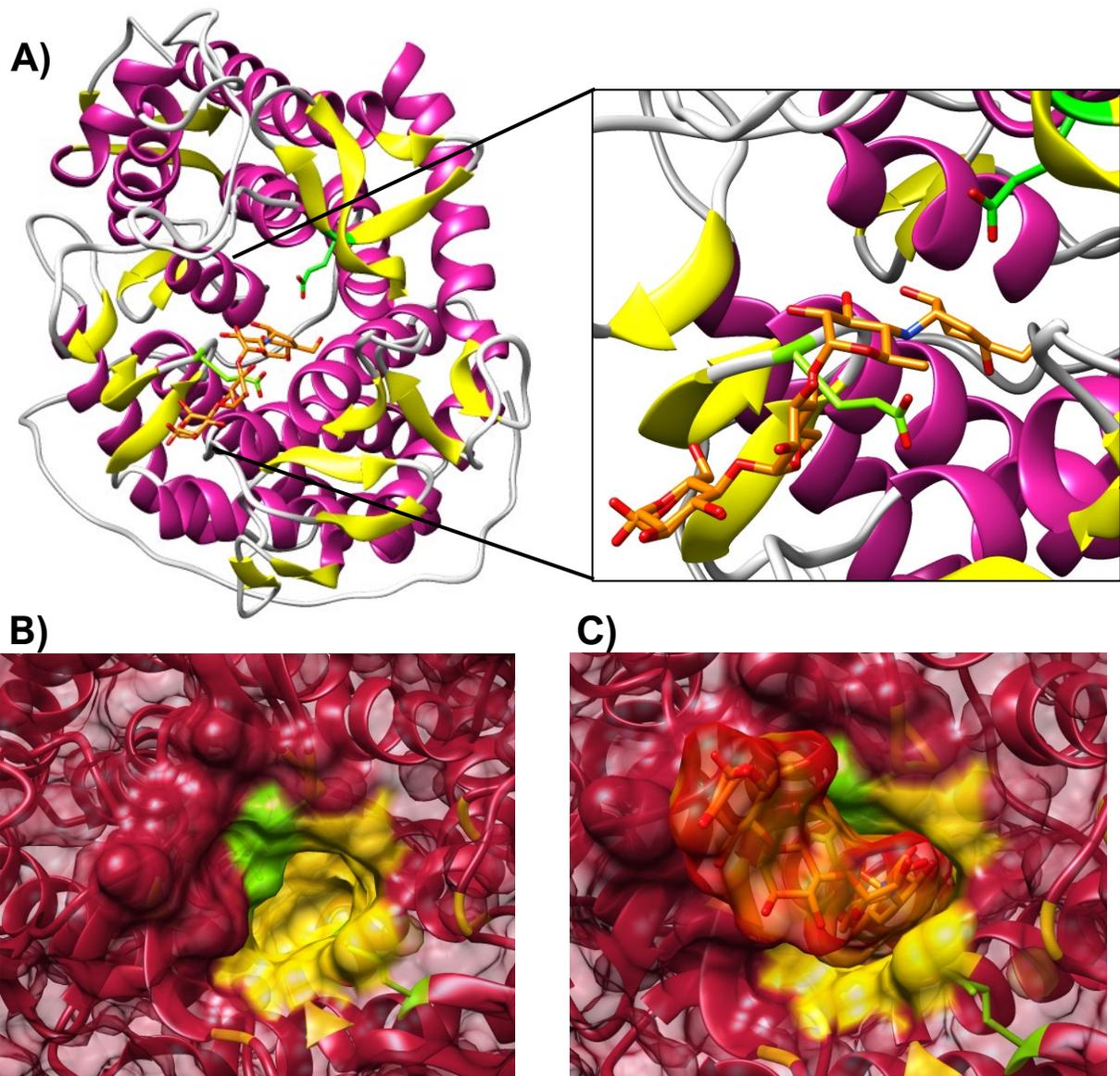


Figura 4. Estructura 3D de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. X100 (PDB: 1AGM). **A** muestra la estructura de listones y se aprecia el plegamiento barril (α/α)₆ que caracteriza a las glucoamilasas. También, se tiene un acercamiento del sitio catalítico en el que se aprecian los residuos catalíticos Glu179 y Glu400 (coloreados en verde) interaccionando con el nitrógeno del inhibidor acarbosa. **B** ilustra a la apoenzima y se observa que el sitio catalítico es similar a un saco (coloreado en amarillo) y en **C** se observa a la holoenzima con el inhibidor acarbosa.

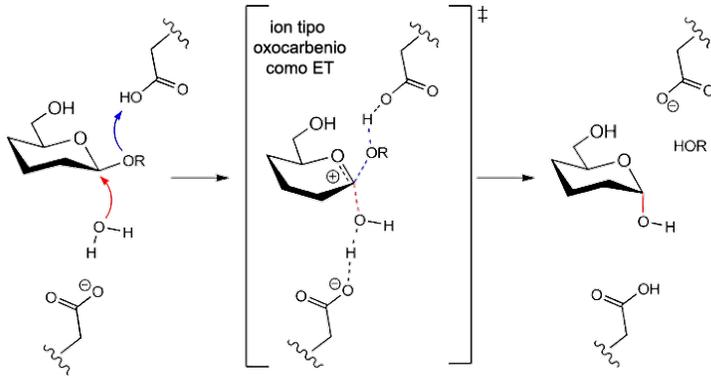
1.7 Mecanismos de hidrólisis de enlaces glicosídicos

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico se lleva a cabo por una catálisis ácido/base a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), que requiere de dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo/base. Esta hidrólisis se puede separar en dos variantes del mecanismo, aquel con retención y aquel con inversión de la configuración anomérica [23].

El mecanismo de inversión ocurre mediante una única sustitución nucleofílica (figura 5a), mientras que el mecanismo de retención hay un doble desplazamiento a través de la formación e hidrólisis de un intermediario covalente (figura 5b). Independientemente del tipo de mecanismo, cada paso de reacción implica un estado de transición (ET) similar al ion oxocarbenio. El ET tipo ion oxocarbenio se caracteriza por la hibridación sp^2 y la carga positiva en el carbono anomérico, que se estabiliza parcialmente mediante la donación de electrones del oxígeno del anillo (figura 6; [24]).

Tanto en los mecanismos de retención como de inversión, la posición del donante de protones es idéntica, es decir, está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno del oxígeno glicosídico. En las enzimas que presentan el mecanismo de retención, la base catalítica nucleófila está muy cerca del carbono anomérico del azúcar. Esta base, sin embargo, es más distante en las enzimas inversoras que deben acomodar una molécula de agua entre la base y el azúcar. Esta diferencia da como resultado una distancia promedio entre los dos residuos catalíticos de $\sim 5.5 \text{ \AA}$ en enzimas con mecanismo de retención y de $\sim 10 \text{ \AA}$ en enzimas con mecanismo de inversión [23].

(a) Mecanismo de inversión - Un desplazamiento



(b) Mecanismo de retención - Doble desplazamiento

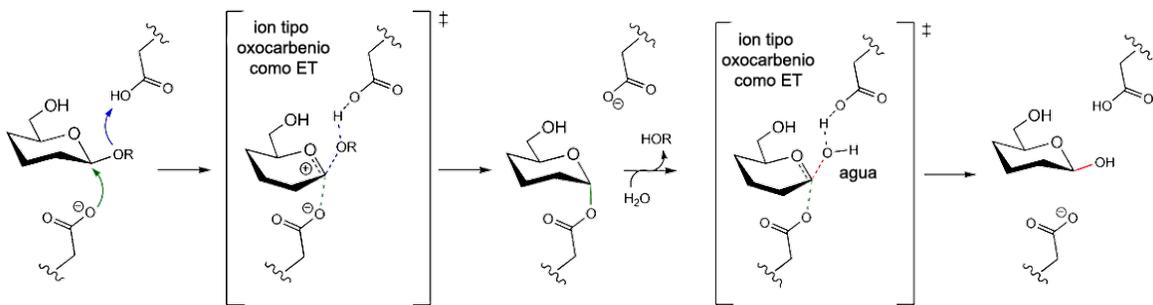


Figura 5. Mecanismos generalizados para la hidrólisis enzimática de glucósidos: (a) Mecanismo de inversión y (b) Mecanismo de retención.

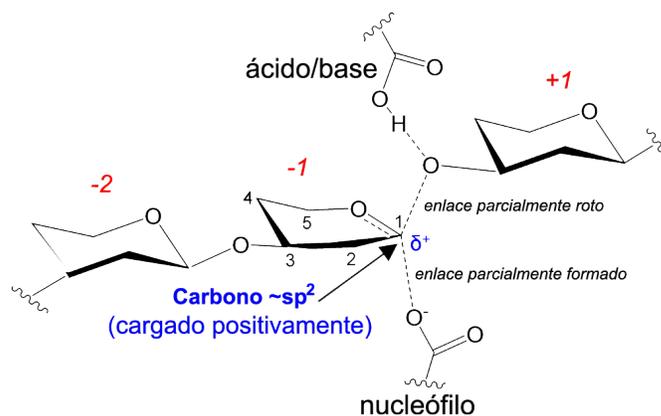


Figura 6. Estado de transición del mecanismo catalítico de retención de las glicohidrolasas para el caso particular de un enlace glicosídico 1,3.

1.8 Enzimas moonlighting

Las proteínas moonlighting son proteínas multifuncionales muy especiales, porque una sola cadena polipeptídica puede realizar múltiples funciones bioquímicas y/o biológicas autónomas. Este tipo de proteínas se distingue de otras proteínas multifuncionales porque no son productos de fusiones de genes, actividades enzimáticas promiscuas, variantes de corte y empalme de ARN, efectos pleiotrópicos o fragmentos proteolíticos [25–27].

Los primeros ejemplos de proteínas moonlighting se describieron a fines de la década de 1980, cuando Piatigorsky y Wistow informaron que ciertas cristalinas (proteínas estructurales que se encuentran en el cristalino, una estructura del ojo de los vertebrados) eran enzimas ya conocidas. Por ejemplo, la ϵ -cristalina del pato resultó ser una lactato deshidrogenasa, mientras que la τ -cristalina de tortuga una enzima glucolítica α -enolasa [25], [26]. Desde este hallazgo inicial, se ha descrito un número creciente de proteínas moonlighting en muchas especies, incluidas plantas, animales, levadura y procariotas [25].

Todavía hasta 1995, era dogma que el producto proteico de cada gen tenía una sola función [25], sin embargo, el concepto de proteína moonlighting rompió el límite clásico entre enzimas y proteínas estructurales, proteínas de transducción de señales o proteínas reguladoras, por lo que las múltiples funciones realizadas por las proteínas podrían abarcar una variedad de funciones biológicas. Estas diferencias funcionales se originan de varios modos no exclusivos [28] como la localización celular, tipo de célula, estado oligomérico, concentración de ligandos, sustratos, cofactores, productos o modificaciones postraduccionales [28, 29].

La aparición de una nueva función puede convertirse en una ventaja para la célula o el organismo porque reduce la cantidad de proteínas que se sintetizarán, lo que hará que su genoma sea más compacto y coordinen mejor las actividades celulares [30].

1.9 Organismo de estudio: *Megathura crenulata*

El molusco marino *M. crenulata* se caracteriza por tener de 6.35 a 10.16 cm de longitud y 5.1 cm de altura. La concha posee un orificio apical grande, con lados redondeados, de un sexto de la longitud de la concha y bordeado externamente por un margen blanco. Su interior es blanco brillante. El margen basal está finamente crenado. El exterior está cubierto de pequeños bultos de color morado-café claro. El animal es mucho más grande que la concha, con un pie masivo de color amarillo y un manto café o negro que casi cubre la concha entera (figura 7). Es un organismo común en muchas áreas rocosas. Habita la costa occidental norteamericana, desde Monterey, California hasta la Baja California en México [31].

M. crenulata es un organismo omnívoro, que se alimenta 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 los tunicados *Didemnum* y *Trididemnum solidum* y el hidrozooario *Eudendrium* [32].

En California, *M. crenulata* tiene una importancia económica, debido a que produce volúmenes relativamente grandes de hemocianina, el cual es un producto usado en inmunología y oncología [33].



Reino: Animalia
Subreino: Metazoa
Phyllum: Mollusca
Clase: Gastropoda
Subclase: Prosobranchia
Orden: Archaeogastropoda
Familia: *Megathura*
Especie: *crenulata*

Figura 7. Molusco marino *Megathura crenulata* y su posición taxonómica.

2 ANTECEDENTES

El medio oceánico es tan extenso que en él habitan una gran diversidad de organismos que permanecen aún sin explorar, por lo que son fuentes potenciales para el aislamiento de enzimas las cuales están dotadas de propiedades únicas que las hacen atractivas [8]. Por ejemplo, las α -amilasas adaptadas al frío de las bacterias marinas *Nocardiopsis sp. 7326* y *Wangia sp. C52*, o la α -amilasa que es ácido base estable de *Bacillus subtilis S8-1* o las α -amilasas tolerantes a concentraciones altas de sal de *Bacillus sp. ALSHL3* y *Zunongwangia profunda* [34]. Así como se han podido aislar α -amilasas de microorganismos, también se han podido aislar de otros organismos como el crustáceo krill antártico *Euphausia superba* el cual tiene una de las amilasas más pequeñas reportadas a la fecha, con una masa molecular de 17 kDa [35]. En el caso de vertebrados marinos se han aislado de los peces herbívoros como *Boops boops* y de peces omnívoros como *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Tinca tinca* y *Pagellus Erythrinus* y se ha observado que estos peces digieren el almidón de sus alimentos de manera más efectiva que los peces carnívoros como *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Sparus aurata*, *Anguilla anguilla* y *Diplodus annularis* [36]. En el caso particular de los invertebrados marinos, se han podido purificar α -amilasas de molusco como el abulón *Haliotis discus discus* [37], del mejillón verde *Perna viridis* [38], del abulón japonés *Haliotis discus hannai* [39] y del mejillón del mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* [40]. Sin embargo, la caracterización de las α -amilasas de estos últimos organismos ha sido a nivel de su bioquímica.

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado a la purificación y caracterización de GHs y lectinas de moluscos marinos y se ha observado que las proteínas de estas fuentes presentan propiedades únicas, por ejemplo, en el caso de las lectinas, nuestro grupo reportó la purificación y la caracterización estructural de la lectina nativa y recombinante del mejillón *Mytilus californianus* [41], ambas lectinas presentaron una fuerte tendencia a la oligomerización en presencia de galactósidos y se observó que el estado oligomérico es de suma importancia para su actividad antifúngica y antimicrobiana.

Por otra parte, en el caso de las GHs, se purificó una enzima multifuncional tipo moonlighting del molusco marino *Megathura crenulata* [42], cuyas funciones fueron de α -amilasa y también de lectina. Como es el caso de toda proteína moonlighting, la actividad de lectina se descubrió por serendipia, ya que los autores identificaron que la enzima se unía a agar sin hidrolizarlo y al hacer pruebas de actividad hemoaglutinante (prueba para determinar la actividad de lectina) resultó positiva. Para la purificación de esta amilasa, los autores recurrieron a los pasos de purificación más frecuentes para amilasas, tales como; precipitaciones con sulfato de amonio y desalado, seguido de cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular. Sin embargo, la función catalítica de la enzima se veía disminuida en las primeras horas de su purificación, por lo que diseñaron una metodología que permitía purificar a la amilasa en un solo paso manteniendo estable la función catalítica de la enzima. Esta metodología de bajo costo consistió en aprovechar que únicamente la amilasa de *M. crenulata* presentó reconocimiento por el agar, por este motivo hicieron un soporte de agar al 2 % para la unión de la enzima. Si bien ya se ha reportado que las amilasas pueden ser purificadas mediante el reconocimiento que tienen por otros polisacáridos como el alginato [43], no se ha reportado, hasta el momento, que una amilasa presente el mismo fenómeno de unión pero dirigido al agar.

3 HIPÓTESIS

Debido a que *Megathura crenulata* es un molusco marino es menos sofisticado, la amilasa presente en su sistema digestivo posee propiedades bioquímicas y estructurales que la distinguen de las amilasas reportadas a la fecha.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Purificar y caracterizar bioquímica, funcional y estructuralmente una amilasa del molusco marino *M. crenulata*.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Purificar una amilasa de *Megathura crenulata* utilizando una cromatografía de afinidad por agar y alginato y determinar el mejor método de purificación.
- 2) Caracterizar bioquímicamente a la enzima pura, esto es determinar la masa molecular de la proteína mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, evaluar los óptimos de actividad en función del pH y temperatura y determinar su especificidad.
- 3) Evaluar el efecto de los iones, sales amortiguadoras y agentes reductores sobre la actividad enzimática.
- 4) Comparar la actividad enzimática de la amilasa de *M. crenulata* con una amilasa comercial.
- 5) Determinar las condiciones óptimas de estabilidad funcional y estructural de la enzima mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido y ensayos de actividad enzimática.
- 6) Estimar el contenido de estructura secundaria de la amilasa mediante estudios de dicroísmo circular en el UV lejano.

5 METODOLOGÍA

5.1 Material biológico

En el presente estudio se seleccionó al molusco marino *Megathura crenulata* como organismo de estudio. Estos se colectaron en la Bahía de Todos Santos, Ensenada Baja California, México y se transportaron vivos al Instituto de Química, UNAM, donde se congelaron a -55°C hasta su posterior uso.

5.2 Tratamiento del material biológico

La extracción del hepatopáncreas y la purificación se realizó en todo momento a una temperatura de 4°C para mantener la función y estabilidad de la amilasa.

El hepatopáncreas fue disectado del molusco y se homogenizó en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con 0.05 % (m/v) NaN_3 para evitar crecimiento microbiano. El extracto se centrifugó a $23\,300 \times g$ durante 30 min, se colectó el sobrenadante por decantación y se almacenó hasta su posterior uso.

5.3 Metodologías de purificación de la α -amilasa del molusco

Megathura crenulata

5.3.1 Cromatografía de afinidad de agar

Se prepararon 200 mL de agar al 2 % m/v en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4, se dispersó calentando a ebullición y se dejó gelificar en una caja Petri de vidrio 150 x 25 mm. El agar gelificado se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm^3 y se lavaron con amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 0.05 % m/v NaN_3 .

Los cubos de agar se dejaron interaccionar con el sobrenadante (apartado 5.2) durante 45 min a 25°C . Concluido el tiempo, se retiró el sobrenadante por decantación y se almacenó. Los cubos de agar fueron lavados cinco veces con 50 mL de amortiguador

de acetatos 50 mM pH 6 0.05% m/v NaN_3 para eliminar las proteínas que no interaccionaron con él. Posteriormente, se realizó un gradiente escalonado de NaCl en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con 0.2, 0.5 y 1.0 M de NaCl. Con cada concentración de NaCl se hicieron cinco lavados con una duración de 15 min cada uno.

Para eluir la enzima de los cubos de agar, se adicionaron 50 mL de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 2 M y se dejó incubar a 4 °C toda una noche. Al día siguiente se colectó el sobrenadante y se adicionaron otros 50 mL del mismo amortiguador de elución y se incubó por otra noche, luego se colectó y se agrupó con la primera elución con NaCl 2 M.

5.3.2 Cromatografía de afinidad de alginato

En este caso se aprovechó la propiedad que tiene el alginato de polimerizar en presencia de cationes divalentes. Se preparó alginato de sodio al 2 % m/v (alginato de viscosidad media $\geq 2\ 000$ cP, de SIGMA) en 100 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y se adicionó por goteo a 1 L de disolución de CaCl_2 100 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8 con la finalidad de que polimerice en forma de perlas de alginato. Estas perlas se lavaron con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 para eliminar el exceso de calcio. Y se dejaron interaccionar con el sobrenadante (apartado 5.2) durante 45 min a 25 °C. Concluido el tiempo se retiró el sobrenadante por decantación. Las perlas de alginato se lavaron 5 veces con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y posteriormente se realizaron lavados con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 con un gradiente escalonado de NaCl; de molaridades 0.15, 0.5, 1.0 M. Cada lavado tuvo una duración de 5 min.

Para eluir la enzima de las perlas de alginato, se adicionaron 50 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 con 1.5 M de NaCl y se dejó incubar a 4 °C toda una noche. Al día siguiente se colectó el sobrenadante y se adicionaron otros 50 mL del mismo amortiguador de elución y se incubó por otra noche, luego se colectó y se agrupó con la primera elución con NaCl 1.5 M.

Con la finalidad de eliminar el alginato remanente en la fracción que se eluye con 1.5 M de NaCl, se adicionó CaCl₂ a una concentración final de 70 mM y se agitó suavemente durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 9 300 x g y se recuperó el sobrenadante por decantación. La adición de CaCl₂ se realizó 4 veces hasta que ya no se observó alginato precipitado. Finalmente, la enzima se dializó contra amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 150 mM para eliminar el exceso de CaCl₂, ajustar el pH y disminuir la salinidad.

5.4 Cuantificación de la enzima

La concentración de enzima se determinó con el método del ácido bicinconínico (BCA) propuesto por Smith *et al.* [44]. Este reactivo permite la detección y la cuantificación de proteína en solución acuosa cuando se coordina al Cu⁺ producido por la reacción de Biuret, en donde el Cu²⁺ se reduce a Cu⁺ por la interacción con moléculas de proteína en un medio alcalino. El compuesto de coordinación BCA-Cu⁺-BCA genera un color púrpura que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 562 nm. El color producido es estable y aumenta en una forma proporcional a la cantidad de proteína.

Para la cuantificación de la enzima se construyó una curva de calibración con un estándar de albumina de suero bovino (BSA) en un intervalo de 5 a 250 µg/mL. Para cada punto de la curva de calibración se pusieron, por triplicado, 50 µL de estándar que se mezcló con 1 mL del reactivo de trabajo del kit de BCA de PIERCE™. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 30 min, se enfriaron y se leyó la absorbancia a 562 nm. Los datos de absorbancia a 562 nm se graficaron en función de la concentración de estándar en µg/mL (figura 8).

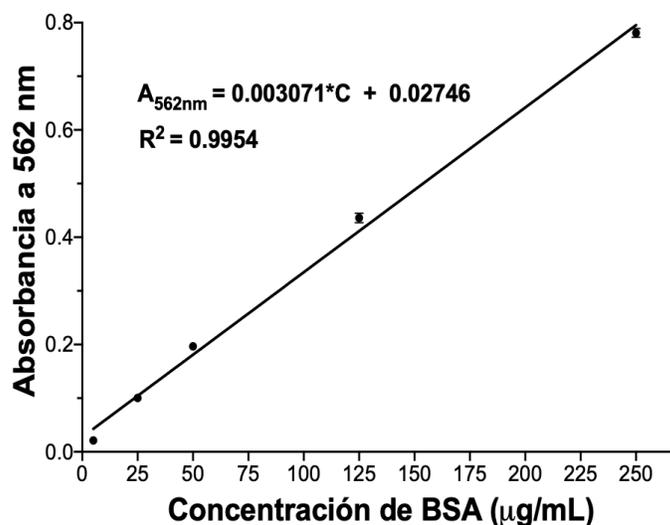


Figura 8. Curva de calibración para la cuantificación de la enzima. Como estándar se usó Albumina de Suero Bovino (BSA) cuantificada por el método del BCA en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 y 200 mM de NaCl. Los valores de absorbancia se leyeron a 562 nm.

5.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La masa molecular de la amilasa fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta es una técnica que puede ionizar y analizar compuestos de masa molecular grande como, por ejemplo, proteínas [45]. Esta técnica se caracteriza por la cocrystalización de la muestra en presencia de un exceso de una matriz absorbente de radiación UV. La ionización del analito ocurre cuando se aplican impulsos láser que golpean la muestra. La detección de iones generalmente se logra mediante el uso de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). El propósito de la matriz es principalmente diluir la muestra y disipar la energía del láser [45].

En el presente estudio se usó ácido sinapínico como matriz, la cual se preparó a saturación en una solución de ácido trifluoroacético 0.1 %, acetonitrilo 30 % y agua 30 %, se cocrystalizó con la amilasa y se analizó en un equipo Microflex Bruker daltonics.

5.6 Ensayos de especificidad.

La determinación de la especificidad de la amilasa se realizó con sustratos derivados de ciclodextrinas que son específicos para la hidrólisis de α -, y γ -amilasa. Como sustratos, se usó *p*-nitrofenol- α -D-maltósido (*p*-NPG2) y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG1). La hidrólisis de estos sustratos genera la formación de maltosa o glucosa (figura 9A, 9B), respectivamente, y *p*-nitrofenol (figura 9C). En condiciones alcalinas el *p*-nitrofenol (pKa 7.15 a 25 °C) se desprotona generando el *p*-nitrofenolato (figura 9C) que puede medirse espectroscópicamente porque el anión absorbe en una longitud de onda de 405 nm.

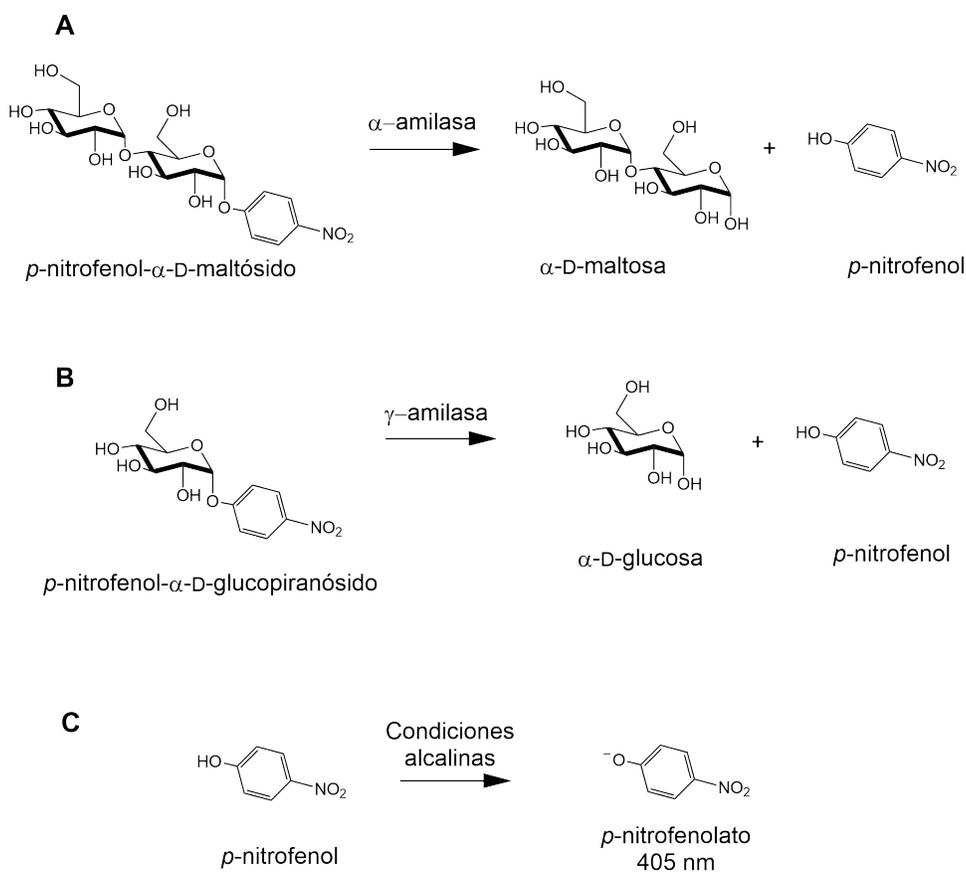


Figura 9. Reacción de hidrólisis de los sustratos cromogénicos. A) muestra la hidrólisis del *p*-NPG2 por la acción de una α -amilasa y B) muestra la hidrólisis del *p*-NPG1 por la acción de una γ -amilasa. En C) se ilustra la desprotonación del *p*-nitrofenol en condiciones alcalinas para la formación del anión *p*-nitrofenolato que produce una coloración amarilla del medio.

Estos sustratos fueron preparados a una concentración 5 mM en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 200 mM. Por triplicado, las muestras se prepararon mezclando 100 μ L de sustrato y 100 μ L de muestra (54 μ g/mL) y el blanco se preparó mezclando 100 μ L de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 200 mM y 100 μ L de muestra (54 μ g/mL). Se incubaron a 50 °C durante 4 hrs. Al finalizar la incubación se adicionaron 200 μ L de Na₂CO₃ 2.75 M (pK_a HCO₃³⁻/CO₃²⁻ = 10.2 a 25 °C) para detener la reacción y desprotonar el *p*-nitrofenol. Luego se leyó la absorbancia a 405 nm. Se calcularon los μ mol de *p*-nitrofenol formado con la ecuación de Lambert-Beer, para lo que se tomó el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol de 18.1 mM⁻¹cm⁻¹. La actividad específica U/mg se definió como los μ mol de *p*-nitrofenol liberados por minuto por miligramo de enzima.

5.7 Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilolítica de las muestras fue evaluada cuantificando los azúcares reductores producidos por la enzima utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por G. L. Miller [46]. Este método colorimétrico es ampliamente usado en la determinación de la actividad enzimática de muchas amilasas. Se basa en la reducción del DNS al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico mientras ocurre la oxidación del grupo carbonilo del azúcar reductor a un ácido carboxílico (figura 10). Para que se lleve a cabo la reacción de oxido-reducción es necesario que el azúcar reductor se encuentre en su forma lineal. Debido a que la forma lineal no es favorecida en solución acuosa [47], es necesario que la mezcla de reacción sea calentada a ebullición para favorecerla. El producto de reducción absorbe radiación electromagnética a 550 nm, por lo que puede ser cuantificado por la ley de Lambert-Beer y la intensidad del color del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico es proporcional al contenido de azúcares reductores en la muestra.

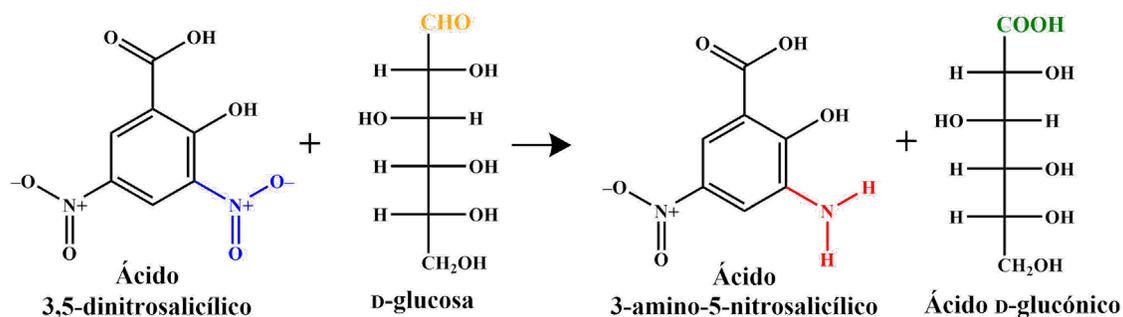


Figura 10. Reacción de oxido-reducción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y la D-glucosa.

Como sustrato se usó almidón soluble de papa (Sigma-Aldrich) al 0.5% (m/v) en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 200 mM. Para cada muestra de enzima se prepararon dos blancos; blanco de enzima y el blanco de sustrato (tabla 1).

Tabla 1. Preparación de las muestras para los ensayos de actividad amilolítica por el método del DNS.

	Blanco de enzima	Blanco de sustrato	Muestra de enzima
Acetatos 50 mM pH 6, NaCl 200 mM	400 µL	250 µL	150 µL
Almidón soluble al 0.5% m/v.	0 µL	250 µL	250 µL
Enzima	100 µL	0 µL	100 µL

Para el método de purificación con agar y alginato de sodio, todas las muestras se incubaron a 40 °C y 50 °C, respectivamente, durante una hora. Posteriormente, se adicionaron a cada muestra 1000 µL del reactivo de DNS y se llevó a ebullición por 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm.

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó extrapolando los datos de absorbancia a 550 nm a una curva de calibración en la que usó D-(+)-maltosa monohidratada como estándar en un intervalo de 0.1 a 0.55 μmol como se observa en la figura 11.

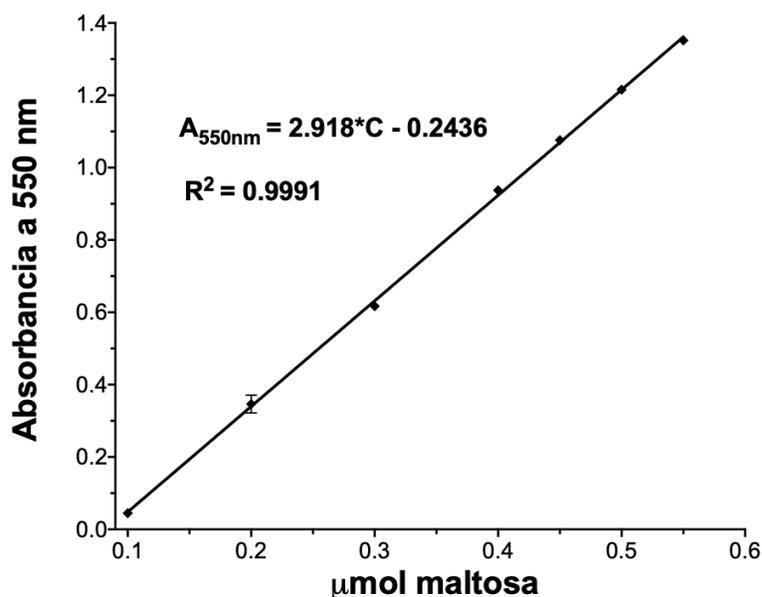


Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores. Se usó D-(+)-maltosa monohidratada como estándar y se cuantificó por el método de DNS. Los valores de absorbancia se leyeron a 550 nm.

5.8 Hidrólisis de ciclodextrinas

Con la finalidad de confirmar que McAmy es una α -amilasa se realizaron ensayos enzimáticos sobre α -, β -, y γ -ciclodextrinas y el resultado se comparó con una α -amilasa conocida comercialmente del *B. licheniformis* (BLA; Sigma-Aldrich A3403). Las muestras fueron preparadas de acuerdo con la tabla 2. Los volúmenes de las ciclodextrinas producen una concentración final 100 mM, por otro lado, las concentraciones finales de McAmy y BLA fueron de 112 $\mu\text{g/mL}$ y 1.7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabla 2. Preparación de las muestras para los ensayos de actividad amilolítica por el método del DNS.

	Blanco de enzima	Blanco de sustrato	Muestra de enzima
Acetatos 50 mM pH 6, NaCl 150 mM	400 μ L	250 μ L	150 μ L
ciclodextrina	0 μ L	250 μ L	250 μ L
Enzima	100 μ L	0 μ L	100 μ L

Las muestras preparadas fueron incubadas a 50 °C durante 24 hrs. Posteriormente, se adicionaron a cada muestra 1000 μ L del reactivo de DNS y se llevó a ebullición por 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm. Los valores de absorbancia fueron extrapolados a la curva de calibración de la figura 10 y valores se graficaron como los μ mol de azúcares producidos por cada una de las enzimas.

5.9 Determinación de parámetros óptimos de la actividad amilolítica de McAmy

5.9.1 Efecto de la temperatura

Para conocer el perfil de actividad amilolítica en función de la temperatura se prepararon muestras de enzima y blancos de sustratos por triplicado (tabla 1). Cada muestra fue incubada a una temperatura específica en un intervalo de 4 °C a 100 °C durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la actividad amilolítica como se describió en el apartado 5.7. Los valores obtenidos se graficaron como actividad relativa en función de la temperatura de incubación.

5.9.2 Efecto del pH

Con la finalidad de conocer el comportamiento de la amilasa en función del pH y determinar su intervalo óptimo, se realizaron pruebas de actividad amilolítica a diferentes valores de pH utilizando el amortiguador universal Britton-Robinson [48]. Este amortiguador brinda la posibilidad de eliminar el efecto de la sal amortiguadora

sobre la actividad amilolítica debido a que puede usarse en un intervalo amplio de pH (2 a 12). Se prepararon por triplicado muestras de enzima y de sustrato (tabla 3) en un intervalo de 4 a 10. Cada blanco de sustrato se preparó en amortiguador universal al pH a evaluar.

Después de la preparación de las muestras, éstas se incubaron a 50 °C durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la actividad amilolítica como se describió en el apartado 5.7. Los valores obtenidos se graficaron como actividad relativa en función del pH.

Tabla 3. Preparación de muestras para los ensayos de actividad amilolítica en función del pH.

	Blanco de sustrato	Muestra de enzima
Amortiguador Britton-Robinson	250 µL	150 µL
Almidón soluble al 0.5% m/v.	250 µL	250 µL
Enzima	0 µL	100 µL

5.10 Estabilidad térmica de *McAmy*

Para obtener información de la estabilidad térmica de la amilasa, se incubaron muestras a diferentes temperaturas en un intervalo de 4 °C a 100 °C durante una hora. Luego se hicieron pruebas de actividad amilolítica residual de esas muestras a 50 °C durante una hora (ver apartado 5.7). Los valores obtenidos se graficaron como actividad residual en función de la temperatura.

5.11 Fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

El ensayo de fluorimetría de barrido diferencial (DSF por sus siglas en inglés), también llamado Thermofluor®, fue desarrollado por Pantoliano *et al.* [49]. El ensayo permite determinar condiciones que estabilizan una proteína tales como el pH y el tipo de sal amortiguadora, aditivos y ligandos [50]. El principio de este ensayo se basa en medir la emisión de fluorescencia de un fluoróforo cuando se une a las regiones hidrofóbicas que se exponen en una proteína debido a su desplegamiento estructural inducido por temperatura (figura 12). El fluoróforo, por ejemplo, SYPRO Orange en un entorno acuoso no presenta emisión de fluorescencia, pero cuando se une a las regiones hidrofóbicas tiene una absorción máxima a 470 nm y una emisión máxima a 569 nm.

En el ensayo, la proteína es calentada en presencia de SYPRO Orange y a medida que la temperatura aumenta, la proteína comienza a desplegarse y a exponer su núcleo hidrofóbico, este proceso conduce a un aumento en la señal de fluorescencia que puede ser medido por un termociclador en tiempo real [51],[52]. Este ensayo da como resultado una curva sigmoide aguda que permite calcular la temperatura de fusión (T_m) de la proteína, la cual corresponde a la temperatura en la que el 50 % de las moléculas de proteína se encuentra en un estado desplegado y 50 % plegado.

Para evaluar la estabilidad térmica de la amilasa, a 1 mL de la enzima en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 200 mM, a una concentración de 0.1 mg/mL se le adicionó 1 μ L del fluoróforo SYPRO® Orange (a una dilución final 1:1000). Se colocaron 10 μ L de la enzima en presencia del fluoróforo en cada pozo de una placa de 96 (MicroAmp Fast 96-well reaction plate 0.1 mL; Applied biosystems) y a cada uno de ellos se le adicionaron 10 μ L de las soluciones a evaluar. La placa se selló con una película ópticamente inerte, para posteriormente centrifugarla a 300 rpm por 2 min a 25°C y colocarla en un equipo de PCR en tiempo real (Applied Biosystems StepOne) siguiendo un programa de inicio de 25°C por 2 min, seguido del incremento de temperatura hasta 98 °C en un lapso de un minuto, para mantenerse ahí por 15 s. Se evaluaron cerca de 190 condiciones de las cuales 96 pertenecieron al kit Aditive

screen (HR2-428) de Hampton Research, que consistió en aditivos orgánicos, caotrópicos, azúcares, detergentes, iones divalentes y monovalentes, agentes reductores y polímeros, entre otros. También, se usó el kit Stock Options pH Buffer (HR2 241) que contenía 45 condiciones que contenían diferentes sales amortiguadoras en un intervalo de pH de 2.2 – 11 en incrementos de 0.2 unidades. Además, se analizaron otros azúcares y amortiguadores que no se encontraban en los kits mencionados.

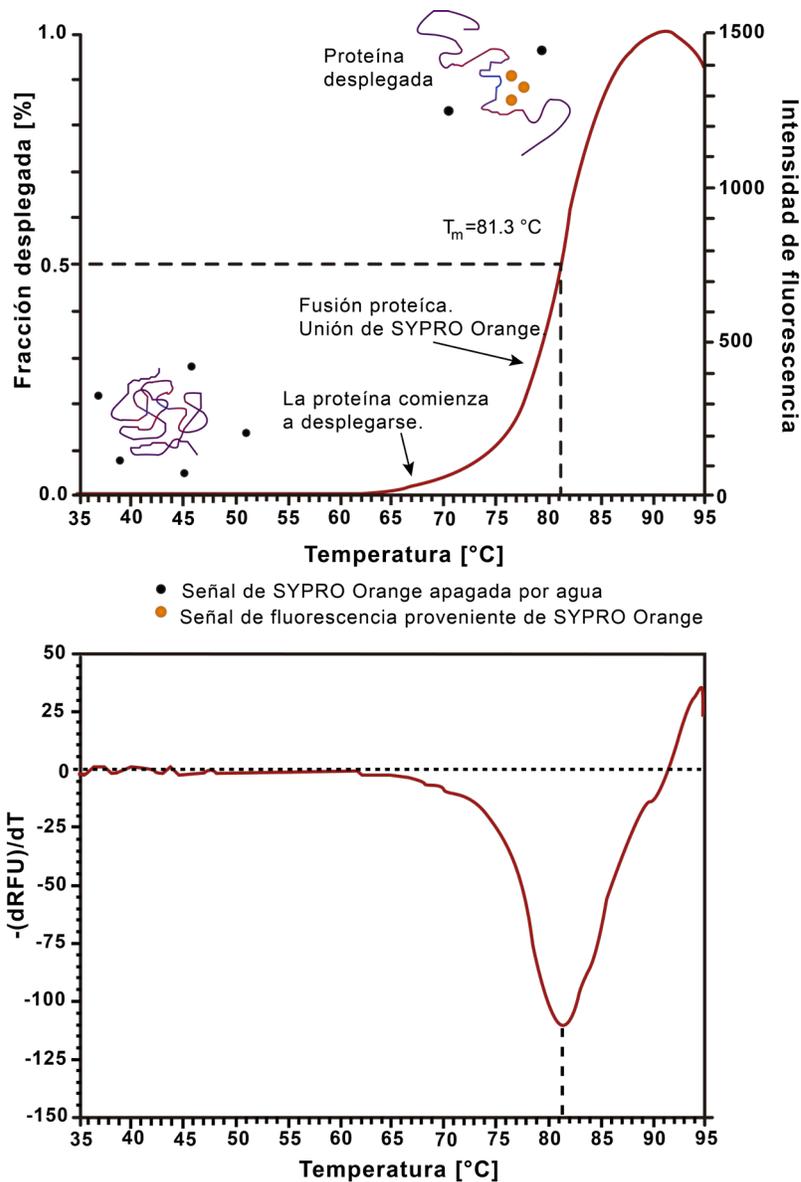


Figura 12. Representación esquemática de los fluorogramas que se obtienen en los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (Modificado de S. Boivin et al. [51]). A) fluorograma normalizado del desplegamiento de una proteína al incrementar la temperatura en presencia del fluoróforo SYPRO Orange. En el eje Y de la derecha se observa que la señal de fluorescencia aumenta debido a que el fluoróforo se une a las regiones hidrófobas que la proteína expone en el desplegamiento de su estructura. A la mitad de la curva sigmoideal (0.5%) se puede obtener la T_m de la proteína. B) representación alternativa para la curva de desnaturalización usando la primera derivada $-(dRFU)/dT$ de los datos crudos, en este caso la T_m corresponde al mínimo.

5.12 Estudios de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano.

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) es un método ampliamente usado para estudiar la estructura secundaria de proteínas. 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 de la luz circularmente polarizados. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α 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, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda (λ) [53].

Los espectros de dicroísmo circular se suelen obtener en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (190 a 260 nm). En la región cercana, los cromóforos más importantes son los anillos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina y fenilalanina. Mientras que la absorción en la región del ultravioleta lejano, se debe a los enlaces peptídicos; su asimetría se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria (hélices, hojas beta, y zonas desestructuradas) [53]. Los espectros de DC en el UV lejano tienen patrones únicos para diferentes elementos estructurales, por ejemplo, proteínas con alto contenido de hélices α tienen un mínimo negativo a 222 nm y otro a 208 nm y un máximo positivo a 193 nm. Por otro lado, proteínas con alto contenido de hebras β antiparalelas tienen un mínimo negativo a 218 nm y un máximo positivo a 195 nm, mientras que las proteínas intrínsecamente desestructuradas tienen una baja elipticidad arriba de 210 nm y un mínimo negativo cerca de 195 nm [54]. En la figura 13 se pueden observar más patrones para otros contenidos de estructuras secundarias.

En este trabajo, el contenido de estructura secundaria de la amilasa se obtuvo a partir del análisis de los espectros de dicroísmo circular, estos espectros se obtuvieron en un espectropolarímetro J-720 (Jasco Inc., EE. UU.) en un intervalo de 190 a 260 nm a 20 °C utilizando una velocidad de barrido de 20 nm/min en una celda de cuarzo de 0.1 cm de longitud de paso de luz. La enzima se dializó contra amortiguador de citratos 10 mM pH 7 con NaCl 50 mM. Cada muestra se analizó por triplicado. A los valores obtenidos se les restó la señal del amortiguador correspondiente (blanco).

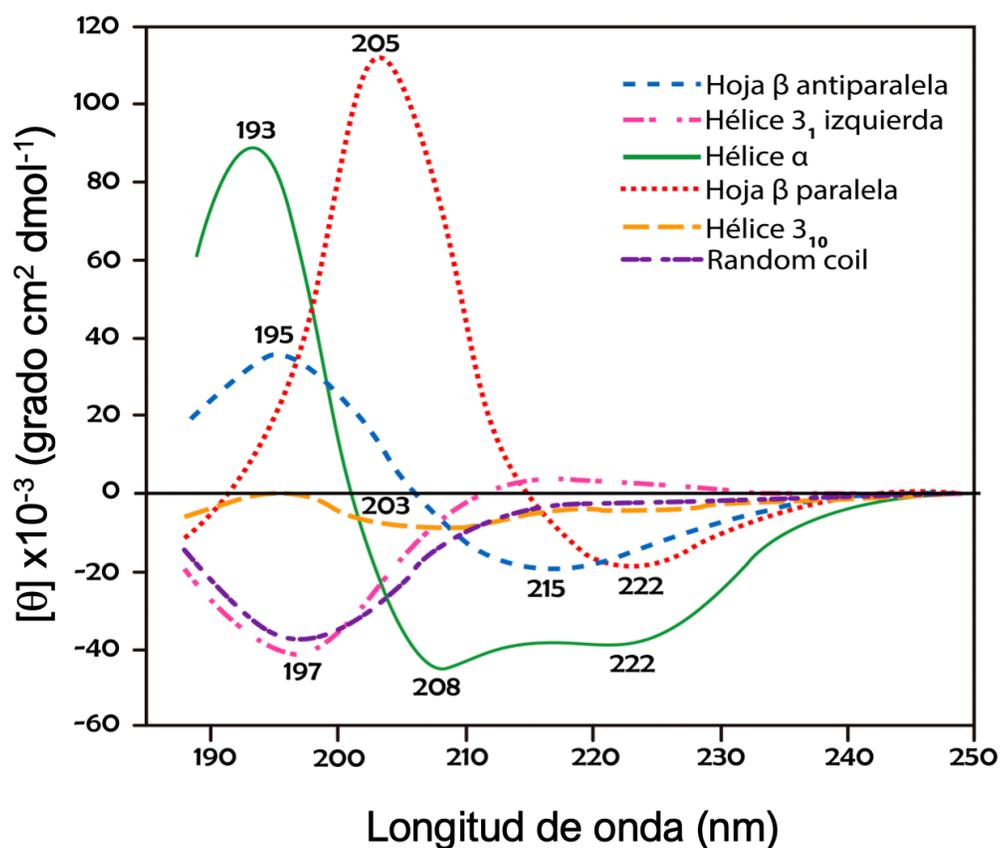


Figura 13. Espectros de DC en el UV lejano donde se observa los patrones producidos por diferentes contenidos de estructuras secundarias de proteínas.

Los espectros fueron expresados como elipticidad molar por residuo medio $[\theta]$:

$$[\theta]_{mrw} = \frac{\theta_{\lambda obs} \times 0.1 \times MRW}{l \times C}$$

$\theta_{\lambda obs}$ = Elipticidad en miligrados a la longitud de onda observada

MRW = Masa media por residuo medio en Da, que se calcula como:

masa molecular de la proteína (Da)/(numero de aminoácidos – 1)

l = longitud del paso óptico (cm)

C = concentración de la enzima en g/mL

La desconvolución de los espectros para la determinación del contenido de estructura secundaria se realizó con el servidor BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/>). BeStSel (Beta Structure Selection) es un servidor web creado para la determinación del contenido de estructura secundaria a partir de los espectros de CD [55]. Este servidor tiene una interfaz sencilla que facilita su uso, así mismo lo distingue de otros servidores porque tomar en cuenta la orientación y la torsión de las láminas β que son responsables de la diversidad espectral de las estructuras β . Además, presenta la novedad de realizar la predicción del plegamiento de la proteína tomando como referencia proteínas depositadas en el PDB.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Purificación

Se logró la purificación de una amilasa del hepatopáncreas del molusco marino *Megathura crenulata* a la que nombramos *McAmy*. La purificación se realizó utilizando dos metodologías diferentes, pero fundamentadas con el mismo principio, es decir que *McAmy* presentó reconocimiento por polisacáridos como el agar y el alginato.

Con la metodología utilizando agar como soporte de purificación, se purificó a *McAmy* en un solo paso. La enzima se eluyó con NaCl 2.0 M en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6. Por otro lado, utilizando las perlas de alginato, la enzima eluyó con NaCl 1.5 M en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y una vez eluída la enzima, se le adicionó la cantidad necesaria de CaCl₂, para llevarla a una concentración final de 70 mM, esto con la finalidad de provocar la precipitación del alginato remante en el medio y eliminarlo por centrifugación. La proteína purificada por ambos métodos se dializó contra un amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 y NaCl 200 mM para eliminar el CaCl₂ en exceso y bajar la salinidad. En las Figuras 14A y 14B se muestran los cromatogramas de la purificación con agar y perlas de alginato respectivamente.

Con la finalidad de determinar qué metodología de purificación era la mejor se determinaron los rendimientos con cada una de ellas.

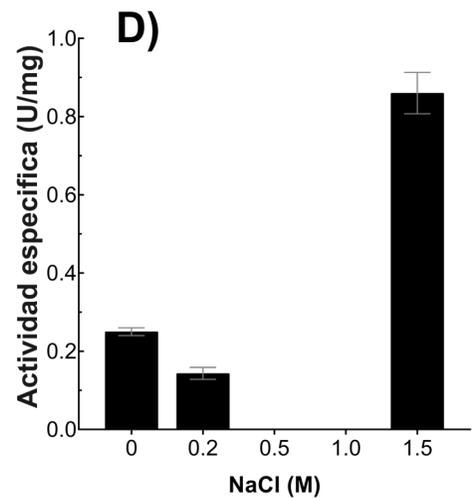
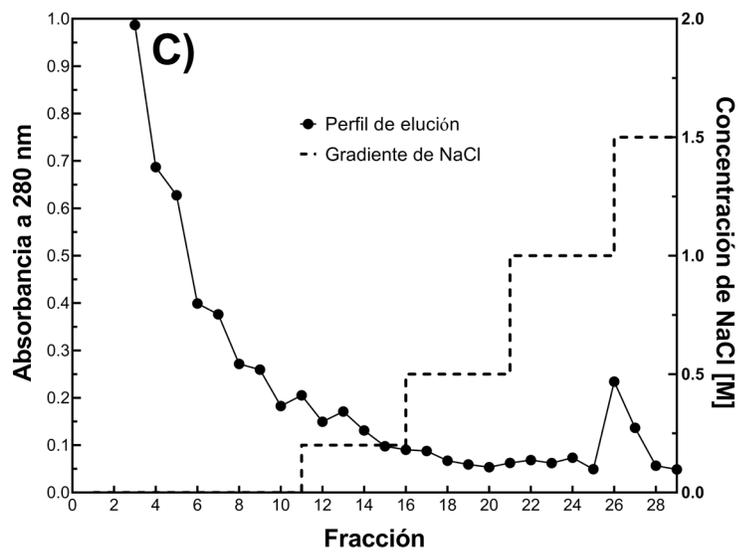
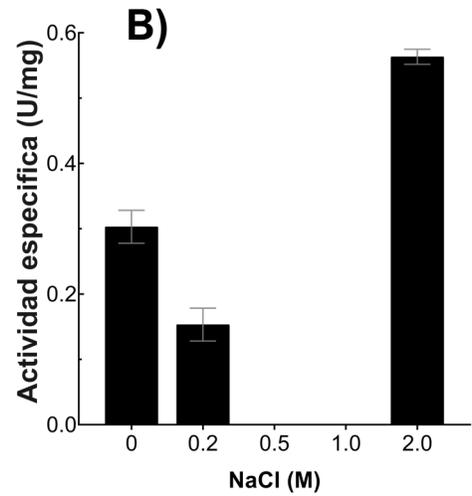
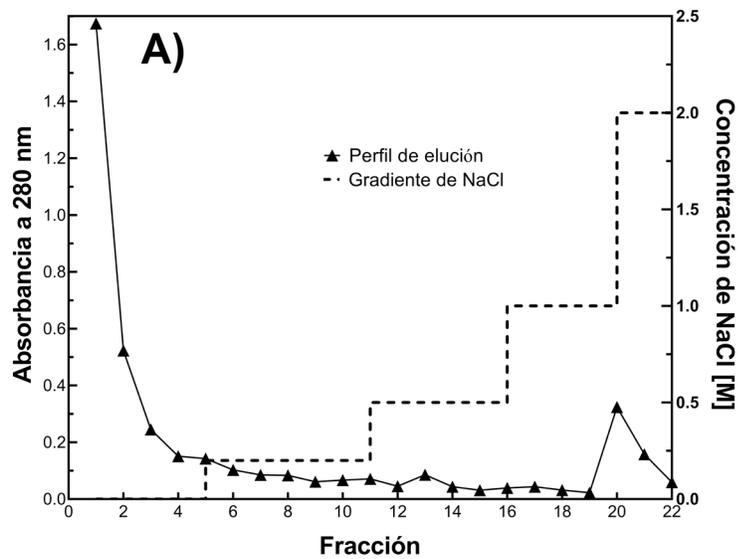


Figura 14. Cromatogramas de la purificación de *McAmy* por cromatografías de afinidad. **A** purificación por el método de reconocimiento a agar y en **B** se muestra su respectivo perfil de actividad. **C** purificación por el método de reconocimiento a alginato y en **D** se muestra su respectivo perfil de actividad.

Tabla 4. Rendimiento de la purificación de la amilasa presente en el hepatopáncreas de *M. crenulata* utilizando la metodología de unión a alginato. El hepatopáncreas pesó 16.34 g (peso húmedo).

Paso de purificación	Proteína total ^{a, b} [mg]	Actividad total ^{a, c} [U]	Actividad específica ^a [U/mg]	Factor de purificación	Rendimiento %
Extracto crudo soluble	891.9 ± 20.9	27 ± 2.4	0.03 ± 0.00	1	100
Cromatografía de afinidad por alginato	10 ± 0.3	9 ± 0.5	0.88 ± 0.08	29	32
Precipitación con CaCl ₂ y diálisis	5 ± 0.1	7 ± 0.3	1.44 ± 0.09	47	27

^a Los experimentos se realizaron por triplicado, en la tabla se muestra el promedio y la desviación estándar de cada uno de ellos.

^b La masa de proteína fue estimada por el método BCA.

^c La actividad se definió como los μmol de maltosa liberados por minuto, bajo condiciones experimentales.

^d La actividad específica se definió como los μmol de maltosa liberados por minuto por mg de proteína.

Tabla 5. Proceso de purificación de la amilasa presente en el hepatopáncreas del organismo marino *M. crenulata* por la metodología de unión a agar. El hepatopáncreas pesó 23.97 g (peso húmedo).

Paso de purificación	Proteína total ^{a, b} [mg]	Actividad total ^{a, c} [U]	Actividad específica ^a [U/mg]	Factor de purificación	Rendimiento %
Extracto crudo soluble.	347.8 ± 13.6	24.1 ± 0.7	0.071 ± 0.004	1	100
Cromatografía de afinidad por agar	21.1 ± 0.3	11.9 ± 0.2	0.562 ± 0.015	8	49

^a Los experimentos se realizaron por triplicado, en la tabla se muestra el promedio y la desviación estándar de cada uno de ellos.

^b La masa de proteína fue estimada por el método BCA.

^c La actividad se definió como los μmol de maltosa liberados por minuto, bajo condiciones experimentales.

^d La actividad específica se definió como los μmol de maltosa liberados por minuto por mg de proteína.

Comparando ambas metodologías (tablas 4 y 5), observamos que, si bien ambas permiten purificar de una forma sencilla a *McAmy* manteniendo su estabilidad, con el método de unión a alginato se observa un mayor factor de purificación y una actividad específica 2.5 veces mayor que con la metodología del agar, por lo que se eligió este método como el más adecuado para la purificación de esta enzima. Además, el método de los cubos de agar tuvo la desventaja de que parte del polisacárido se solubilizaba en el medio y no podía ser removido ni por métodos cromatográficos ni por métodos físicos, ya que, al parecer, la amilasa tenía una alta afinidad por el agar. Esto hizo que en experimentos subsecuentes como, por ejemplo, en los geles SDS-PAGE las bandas se observaran borrosas y que en los espectros de masas no se observará una señal clara. Algo interesante de notar fue que la actividad amilolítica era muy alta aún en presencia del alginato, lo que nos llevó a pensar que el sitio de reconocimiento a carbohidratos era independiente del sitio catalítico. Por otro lado, nuestro grupo de investigación realizó pruebas de actividad de lectina a la α -amilasa purificada con el método del alginato dando un resultado positivo para la aglutinación de eritrocitos. Posteriormente, se realizaron pruebas de inhibición de la actividad hemaglutinante para determinar el tipo de azúcar por el cual la α -amilasa con actividad de lectina era específica. Los resultados mostraron que se tenía una preferencia por galactósidos. Este resultado fue muy importante para explicar por qué una α -amilasa es capaz de unirse al agar sin hidrolizarlo, ya que el agar está compuesto por unidades alternadas de D-galactosa y de la 3,6-anhidro-L-galactopiranososa, unidas por enlaces α -(1-3) y β -(1-4) (agarosa) y de D-galactosa y L-galactosa fuertemente modificadas con grupos secundarios ácidos, como el sulfato y el piruvato (agaropectina). Por lo tanto, la unión de esta α -amilasa a los polisacáridos como el agar y el alginato es debida a una función secundaria como lectina. Esto es de suma importancia, ya que hasta la fecha no se había podido explicar por qué algunas amilasas se unen, por ejemplo, al alginato [43]. Faltaría esclarecer del todo el tipo de multifuncionalidad para este fenómeno, pero de ser una enzima moonlighting sería la primera α -amilasa reportada como tal.

Para validar la pureza y la masa molecular de la enzima se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF. Como puede observarse en la figura 15 hay un solo pico cuya masa molecular indicada es de 18.3 kDa.

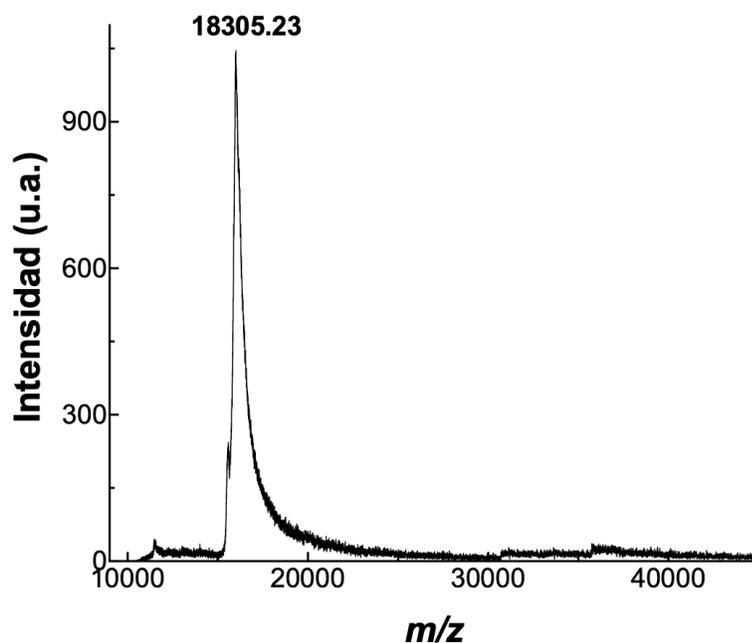


Figura 15. Espectro de masas de McAmy purificada utilizando perlas de alginato. Se utilizó ácido sinapínico como matriz.

Esta masa molecular resulta ser baja con respecto al promedio de las α -amilasas en general que oscilan entre 20-55 kDa, así como las α -amilasas de otros moluscos marinos (tabla 6).

Tabla 6. Masas moleculares de las α -amilasas de moluscos marinos.

Fuente de la α -amilasa	Masa molecular (kDa)	Referencia
<i>Haliotis discus hannai</i>	58	[39]
<i>Haliotis discus hannai</i>	82	[39]
<i>Haliotis discus discus</i>	54	[37]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Forma II)	66	[40]

La α -amilasa más pequeña de un organismo marino que se han reportado hasta la fecha es la α -amilasa del crustáceo krill antártico *Euphausia superba* con una masa molecular de 17 kDa [35]. Por otro lado, se ha reportado recientemente una α -amilasa alcalina de 12.2 kDa del microorganismo *Geobacillus jabois sp. nov.* [56]. Las ventajas que se tienen para este tipo de enzimas pequeñas es que los genes que las codifican también son pequeños, por lo que resultan más fáciles de manejar, particularmente en técnicas recombinantes. Además, las enzimas podrían inmovilizarse en soportes más fácilmente para aumentar la selectividad y reutilización de la enzima para aplicaciones biotecnológicas.

Por otra parte, la actividad enzimática específica de *McAmy* fue de 1.44 U/mg, siendo superior a la α -amilasa del abulón *Haliotis discus discus* (0.1 U/mg) [37], determinado en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 6.5 y los azúcares reductores por el método del DNS, pero inferior a las α -amilasas *HdAmy58* (47 U/mg) y *HdAmy82* (29 U/mg) del abulón japonés *Haliotis discus hannai* [39], determinados en amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 6.0 y los azúcares reductores por el método de la reducción del ferrocianuro de hierro(III), y de las α -amilasas Forma I (42.16 U/mg) y Forma II (7.85 U/mg) del mejillón del mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* [40], determinados en amortiguador de acetatos 107 mM pH 7.0 NaCl 107 mM con CaCl_2 40 mM y los azúcares reductores por el método del DNS.

6.2 Ensayos de especificidad

Para determinar si *McAmy* era α - o γ -amilasa, se incubó en presencia de los sustratos sintéticos *p*-NPG2 y *p*-NPG1 y se cuantificaron los μmol de *p*-nitrofenol liberados por minuto por miligramo de enzima. En la figura 16 se observa que *McAmy* era una α -amilasa que hidroliza los sustratos sintéticos con mayor eficiencia que la α -amilasa comercial de *B. licheniformis* (BLA; Sigma-Aldrich A3403). Con el sustrato *p*-NPG2 se observó que *McAmy* es 3.3 veces más activa que BLA y con el *p*-NPG1 fue

3.6 veces más activa, por lo que *McAmy* puede hidrolizar cualquier cadena de α -glucanos para llevarla hasta unidades fundamentales de glucosa.

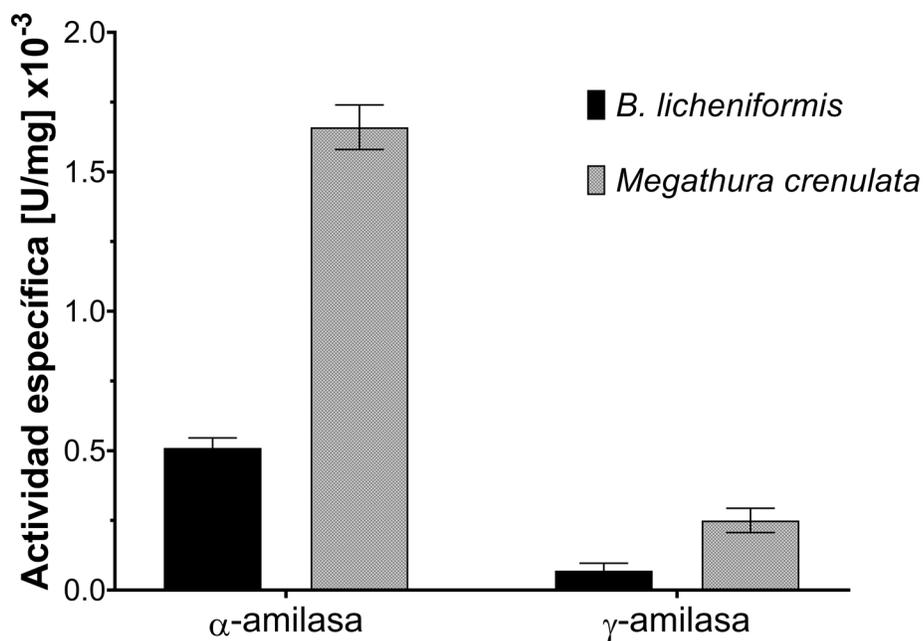


Figura 16. Ensayo de actividad enzimática para la determinación de la especificidad de *McAmy* con los sustratos sintéticos *p*-nitrofenol- α -D-maltósido y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, respectivamente.

Huanyu Zhuo *et al.* [57] obtuvieron la estructura cristalográfica de la α -amilasa pancreática de cerdo en presencia de *p*-nitrofenol- α -D-maltósido. En la zona correspondiente al subsitio -2 del sitio catalítico observaron la presencia de una unidad de *p*-nitrofenol (figura 17). Los autores argumentan que la unión del producto al subsitio -2, después de la hidrólisis de las moléculas de *p*-nitrofenol- α -D-maltósido, puede explicar la baja eficiencia catalítica para la hidrólisis de este sustrato por la α -amilasa pancreática de cerdo, ya que como se puede observar el *p*-nitrofenol bloquea el sitio catalítico para continuar con la hidrólisis de manera eficiente.

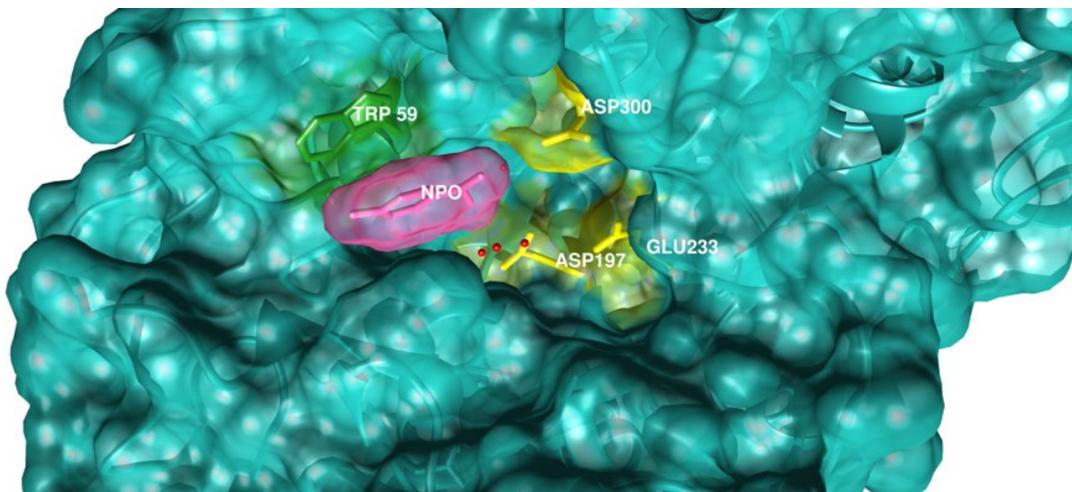


Figura 17. Estructura cristalográfica de la α -amilasa pancreática de cerdo (PDB 1VAH). En amarillo se muestra la triada catalítica (Asp300, Glu233 y Asp197), en verde se muestra el Trp59, residuo que se encuentra en el subsitio -2 del sitio catalítico e interactúa con el p-nitrofenol (coloreado en magenta).

6.3 Ensayo comparativo de actividad amilolítica

Se evaluó la actividad catalítica de *McAmy* para una posible aplicación biotecnológica y se comparó contra la α -amilasa comercial BLA (Sigma-Aldrich A3403) usando almidón como sustrato. Se observó que la actividad catalítica fue mucho mayor con BLA que con *McAmy* (figura 18). Una posible explicación de este resultado es que *McAmy* es una de las amilasas más pequeñas que se ha reportado hasta la fecha, al ser pequeña el dominio B puede estar truncado, el cual es muy importante en la estructura tridimensional de las α -amilasas, este dominio (junto con el dominio A) forman la arquitectura del sitio catalítico, por lo que puede impedir que el almidón se ancle eficientemente como sucede con BLA.

Este resultado junto con lo mostrado en el apartado 6.2 expuso la posibilidad de cuestionar si *McAmy* fuese una γ -amilasa, ya que su actividad específica es baja en un sustrato de cadena larga como el almidón, pero a su vez mayor con sustratos más pequeños como los p-nitrofenol glicósidos, todo lo anterior en comparación con la α amilasa comercial BLA. Para esclarecer este punto se realizó una prueba de actividad

usando α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, ya que estas ciclodextrinas son resistentes a β -amilasas y γ -amilasas por no contar con algún extremo no reductor para efectuar la hidrólisis, mientras que las α -amilasas pueden hidrolizarlas porque su modo de hidrólisis es endo. Aunque en la figura 19 se observa baja producción de azúcares reductores éstos son existentes, si McAmy fuese una γ -amilasa de ninguna manera podría generar azúcares reductores.

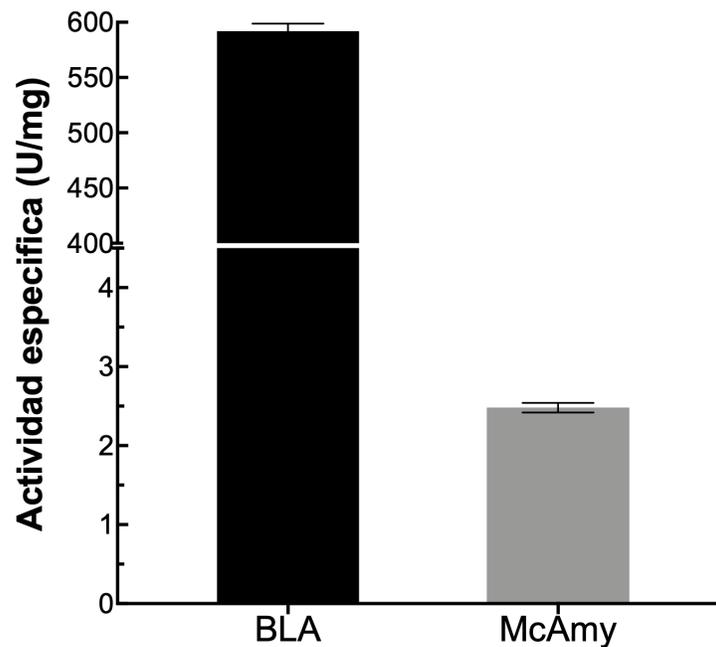


Figura 18. Ensayo comparativo de la actividad catalítica de *McAmy* frente a BLA. La actividad específica (U/mg) se definió como los μmol de maltosa liberada por minuto por mg de enzima

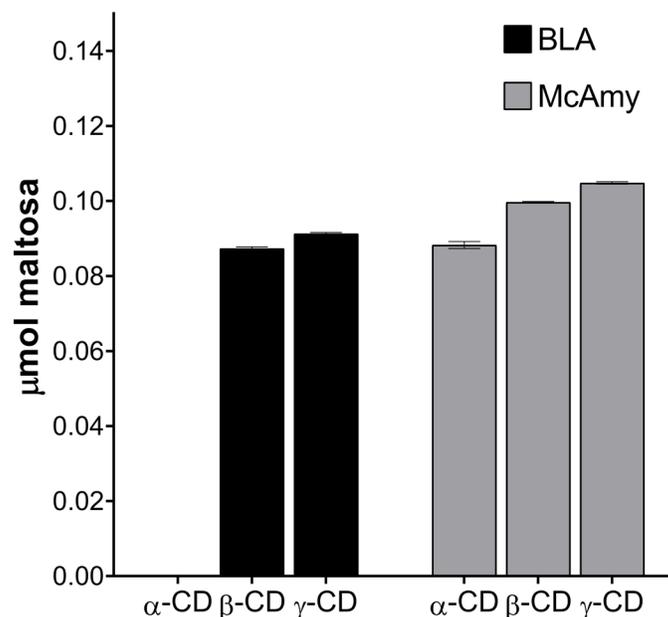


Figura 19. Producción de azúcares reductores por BLA y McAmy en presencia de ciclodextrinas.

6.4 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad amilolítica

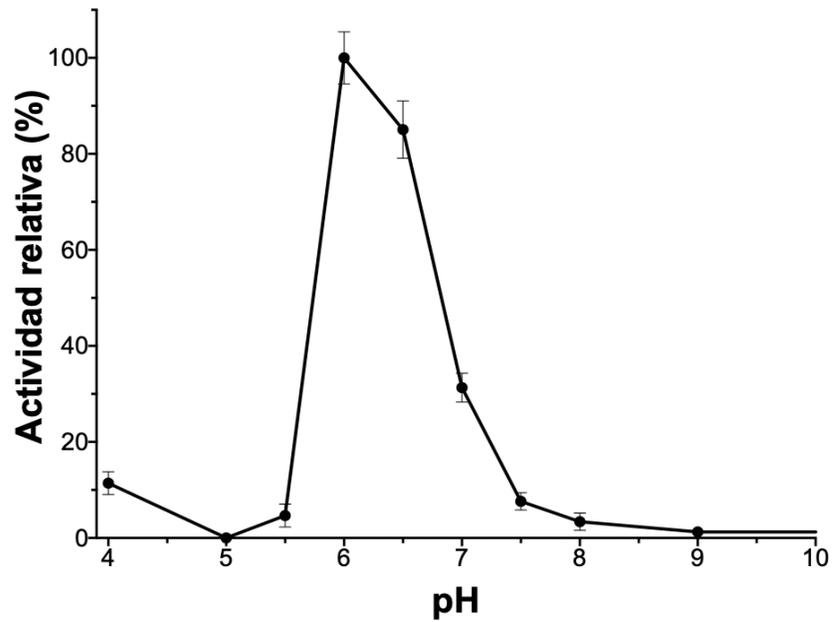
De manera general, las amilasas pueden hidrolizar el almidón en un amplio intervalo de pH (2 a 12) y de temperatura (4 °C a 130 °C) [36], [58]. Para definir estos parámetros, se realizaron pruebas de actividad amilolítica en un intervalo de pH 4 a 12 usando el amortiguador universal Britton-Robinson [48]. El objetivo de usar específicamente amortiguador Britton-Robinson es debido a que permite eliminar el efecto que tienen las sales amortiguadoras sobre la actividad enzimática, ya que tiene un amplio intervalo de amortiguamiento, 2 a 12 en la escala de pH.

En la Figura 20 se observa el comportamiento de *McAmy* a diferentes valores de pH y temperatura. *McAmy* puede mantener el 50 % de su actividad amilolítica en un intervalo de pH de 5.8 a 6.8 y en un intervalo de temperatura de 35 °C hasta 57 °C. Se obtuvo un óptimo de actividad amilolítica a pH 6 y a 50 °C, muy cercano a los ya reportados para otras especies de moluscos como el abulón (*Halotis discus discus*) cuya α-amilasa tiene óptimos de pH y temperatura de 6.5 y 50 °C [37], la α-amilasa del mejillón

verde (*Perna viridis*) tiene un óptimo de 5.0-5.8 y 43 °C [38], la dos α -amilasa *HdAmy58* y *HdAmy82* caracterizadas del abulón japonés (*Haliotis discus hannai*) tienen óptimos de 6.7 a 30 °C y 6.1 a 30 °C, respectivamente [39], también se ha purificado una α -amilasa del mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) con óptimos de 6.5 y 35 °C [40].

De acuerdo con estos datos *McAmy* es una amilasa con características de pH y temperatura que podría aplicarse a la industria del pan (ver figura 1), sin embargo, su baja actividad catalítica no la hacen apta para ello.

A)



B)

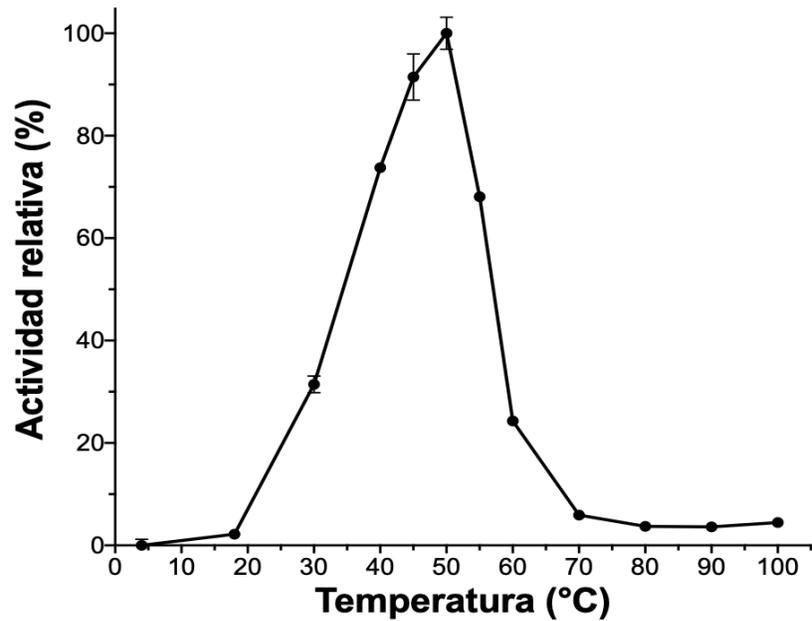


Figura 20. Óptimos de actividad amilolítica de *McAmy*. A) En función del pH y B) en función de la temperatura.

6.5 Efecto de las sales amortiguadoras

Para realizar una caracterización bioquímica de enzimas es fundamental determinar el pH óptimo de actividad. Sin embargo, en los ensayos con amilasas no se suelen considerar los efectos estabilizantes o desestabilizantes del amortiguador, ya que en la mayoría de ellos suelen usar diferentes amortiguadores indiscriminadamente para determinar el óptimo de pH. Se ha observado que los efectos de estabilización o desestabilización de una proteína a causa de la sal que compone el amortiguador son muy diversos [59]. En el caso de las amilasas, por ejemplo, se ha observado que el amortiguador Tris puede ser un inhibidor competitivo, ya que se ha reportado, por cristalografía de rayos X, su presencia en el sitio activo de la α -amilasa del organismo *Alteromonas haloplanctis* [60]. Por lo anterior decidimos evaluar el efecto de la sal del amortiguador en la actividad de *McAmy* por lo que se determinó su actividad específica en amortiguador de acetatos, Bis-Tris, fosfatos y MES a la misma concentración y pH (50 mM y pH 6, respectivamente). En la figura 21 se muestra que la actividad amilolítica de *McAmy* presenta el siguiente orden: acetatos > MES > fosfatos > Bis-Tris. Es decir, que el mejor amortiguador fue el de acetatos, en el que se obtuvo la mayor actividad (20.5 veces mayor en comparación con Bis-Tris). Es posible que el Bis-Tris pueda estar interaccionando con el sitio activo como un inhibidor competitivo como en el caso de la α -amilasa de *Alteromonas haloplanctis*. Por otro lado, los amortiguadores de fosfatos y MES tuvieron un decremento de la actividad de 6.5 y 3.1 veces respectivamente en comparación con acetatos.

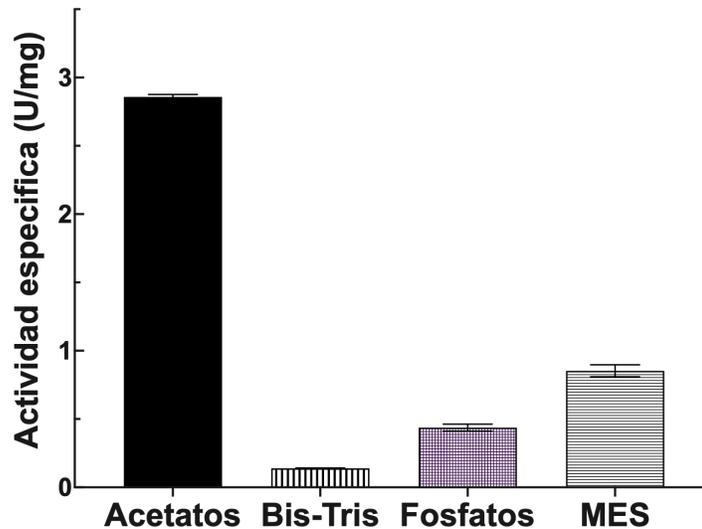


Figura 21. Efecto de las sales amortiguadoras en la actividad catalítica de *McAmy*. Los amortiguadores se prepararon a una concentración de 50 mM, pH 6 con NaCl 200 mM.

6.6 Ensayos de actividad amilolítica con agentes reductores

En la literatura pueden encontrarse diversos ejemplos de estudios bioquímicos en los que se observa que agentes reductores como el β -mercaptoetanol (β -ME) y ditioneitol (DTT) incrementan la actividad amilolítica de las α -amilasas. Liu *et al* [61] explicaron este fenómeno argumentando que el DTT disminuye el tamaño de los agregados, debido a la ruptura de los puentes disulfuro formados por los residuos de Cys que se encuentran libres en la superficie de dos monómeros. Este hecho es factible para nuestra enzima de estudio, ya que en nuestro grupo de trabajo se ha observado que las proteínas de moluscos marinos tienen una fuerte tendencia a la oligomerización, si este proceso ocurre ordenadamente proporciona ventajas estructurales a la proteínas como, por ejemplo, mayor resistencia térmica o ventajas funcionales como el aumento de su actividad o, por el contrario, este proceso puede ocurrir de manera desordenada provocando impedimento estérico de un sustrato al sitio catalítico o la desestabilización de la proteína llevándola, incluso, a la precipitación. Con este antecedente se probaron dos agentes reductores: DTT y el tris (2-carboxietil) fosfina

(TCEP) a una concentración de 5 mM. Además, se probó el efecto de dos agentes derivatizantes de cisteínas: metil metanotiosulfonato (MMTS) y la N-etilmaleimida (NEM) a una concentración de 5 mM con la finalidad de identificar, cualitativamente, cisteínas que pudieran estar en el sitio catalítico. En la figura 22 se observa que la actividad amilolítica aumenta 140 % en presencia de DTT, lo que comprueba que *McAmy* forma agregados (u oligómeros) que se rompen en presencia de este agente reductor, como lo han explicado Liu *et al* [61]. Con respecto al agente reductor TCEP, se puede observar que la actividad es inhibida en su totalidad.

Por otro lado, el efecto de los agentes derivatizantes de cisteínas libres MMTS y NEM, sugieren que hay residuos de Cys implicados en la actividad de *McAmy*, que al unirse covalentemente a las cisteínas impide la entrada del sustrato ocasionando la inhibición total de la actividad catalítica.

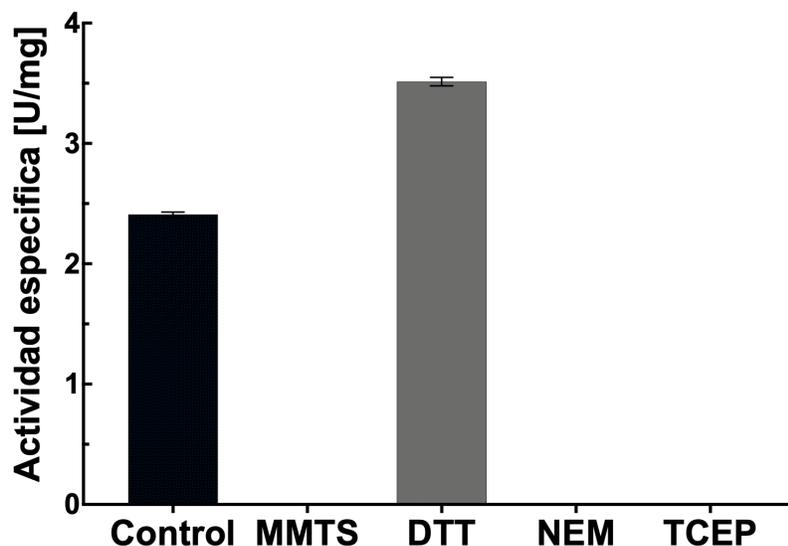


Figura 22. Ensayos de actividad catalítica en presencia de agentes reductores (DDT y TCEP) y agentes derivatizantes (MMTS y NEM) a una concentración 5 mM, amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con NaCl 150 mM y 50 °C.

6.7 Estudio de estabilidad estructural y estabilidad funcional

Los ensayos de estabilidad funcional se determinaron incubando a la enzima a diferentes temperaturas (figura 23) con la finalidad de obtener información de la máxima temperatura a la que *McAmy* deja de ser funcional. Los resultados mostraron que *McAmy* tuvo un intervalo óptimo de estabilidad que va de los 4 °C hasta los 40 °C, después de 40 °C la actividad amilolítica decreció y se pudo mantener el 50 % de la actividad a 50 °C. Estos intervalos de estabilidad son propios de organismos mesófilos como el molusco marino *M. crenulata*.

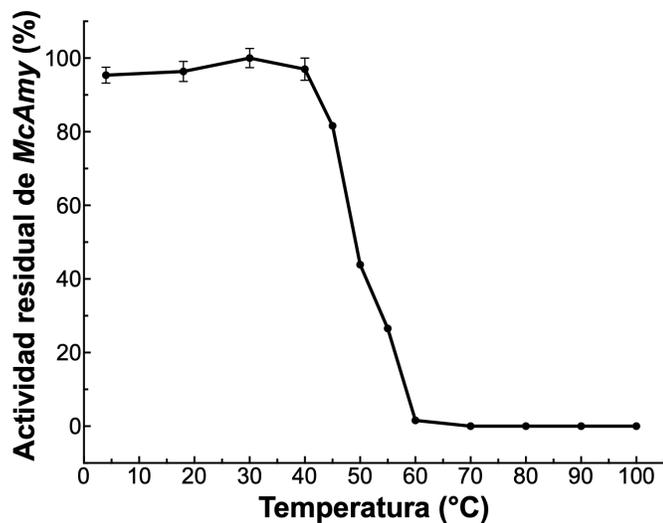


Figura 23. Estabilidad térmica funcional de *McAmy*

Con el objetivo de encontrar condiciones que permitieran mejorar la estabilidad de la enzima, se realizaron ensayos por DSF. Para ello, se probaron cerca de 190 aditivos repartidos entre compuestos orgánicos, caotrópicos, azúcares, detergentes, iones divalentes y monovalentes, agentes reductores y polímeros, entre otros. La enzima se colocó en presencia de estos aditivos en un gradiente de temperatura de 25 °C a 98 °C. En la figura 24 no se observó señal de fluorescencia de la proteína en amortiguador de acetatos siendo indicativo que *McAmy* es bastante estable estructuralmente debido a que la proteína no se desplegó por el incremento en la temperatura en el intervalo aplicado. Con los resultados obtenidos de este ensayo, así como de los ensayos del

efecto de las sales amortiguadoras (apartado 6.5) se puede concluir que *McAmy* es estable funcional y estructuralmente en amortiguador de acetatos. Por el contrario, los amortiguadores MES pH 6.5 y citratos pH 7 sus T_m 's bajan a 47.60 °C y 86.12 °C, respectivamente, con respecto a la T_m que se presenta en amortiguador de acetatos (> 98 °C), este fenómeno lo adjudicamos a una solubilización desfavorable de los oligómeros o incluso que se deba solamente a una desestabilización estructural que afecta al sitio catalítico, de esta manera se explica la disminución de la actividad catalítica que tiene el amortiguador MES en el apartado 6.5 y que esto también suceda con el amortiguador de citratos.

Por otro lado, se observó que *McAmy* en presencia de su sustrato tiene una T_m de 58.85 °C, esta temperatura corresponde a la temperatura a la cual *McAmy* deja de ser activa totalmente en los ensayos de actividad funcional (figura 23). *McAmy* en presencia de L-glutation bajó su estabilidad estructural (T_m 55.75 °C).

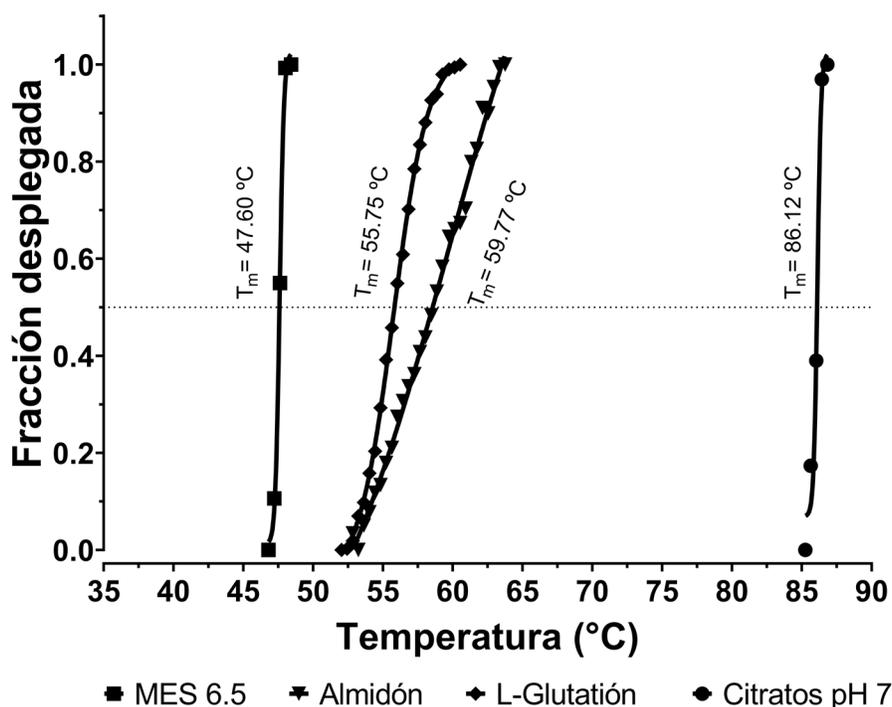


Figura 24. Estabilidad térmica estructural de *McAmy* determinada por DSF.

6.8 Efecto de los iones y aditivos en la actividad enzimática

El efecto provocado por la adición de iones como Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y aditivos como DTT y sorbitol fueron medidos mediante ensayos de actividad enzimática (figura 25). Los resultados del ensayo mostraron que si bien el ion Ca^{2+} incrementa la actividad catalítica en un 153 %, *McAmy* no lo necesita para llevar a cabo la hidrólisis del almidón, es decir, no es dependiente de Ca^{2+} esto se comprobó ya que aún después hacer pasar a *McAmy* por una columna quelatante sigue manteniendo su actividad catalítica. Esto a nivel industrial es de suma importancia, ya que las amilasas calcio dependientes tienen sus desventajas debido a que el ion Ca^{2+} acelera el deterioro de los equipos industriales por la precipitación de oxalato de calcio, el cual puede bloquear las tuberías y los intercambiadores de calor, así como causar la inhibición de la isomerización de la glucosa y también puede acumularse en el producto final en la industria de producción de fructosa y cerveza [62]. Fue interesante notar que otros iones divalentes como el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} disminuyeron la actividad de *McAmy*. Por otro lado, la actividad aumentó significativamente en presencia de DTT, Sorbitol y Mg^{2+} . Se realizaron mezclas con Ca^{2+} y DTT y se observó un aumento en la actividad catalítica del tipo aditivo, la misma mezcla, pero sorbitol parece alterar la actividad. *McAmy* en presencia de Ca^{2+} y DTT fue la combinación que permitió la mayor actividad específica (3.3 U/mg).

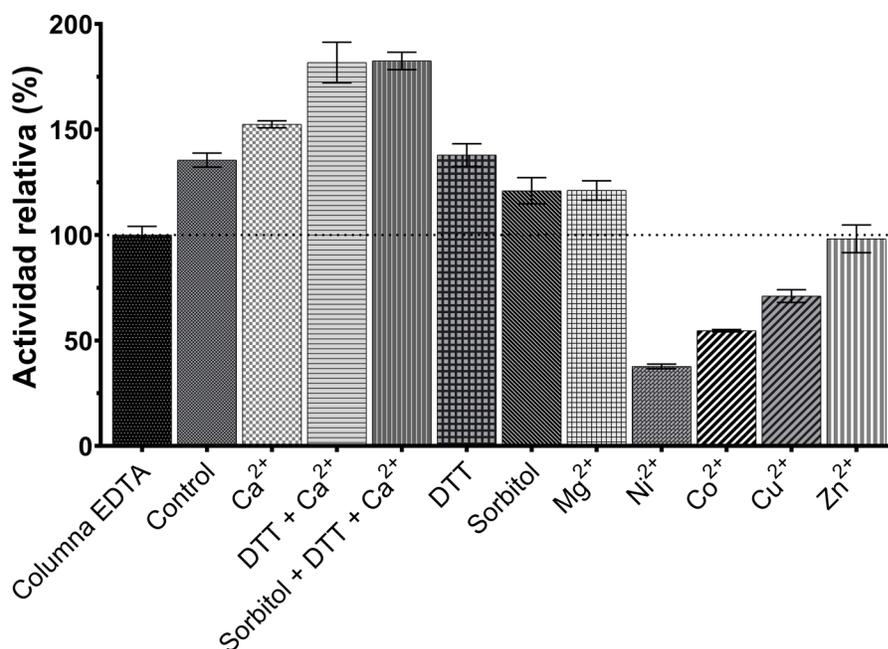


Figura 25. Efecto de iones y aditivos en la actividad catalítica de *McAmy*.

6.9 Estudios de dicroísmo circular.

Como se ha discutido con anterioridad, el comportamiento de *McAmy* parece alejarse de las α -amilasas convencionales, su tamaño, por ejemplo, llamó la atención y se especuló que esta amilasa sólo estuviera manifestando un sólo dominio catalítico como las β -amilasas, asimismo como su multifuncionalidad, la cual formula incógnitas sobre el tipo de plegamiento que tiene *McAmy*. Para conocer más de su estructura, se realizaron estudios de DC en el UV lejano. Los resultados mostraron que *McAmy* presentaba un único mínimo a 215 nm que indica el predominio de hebras β antiparalelas. Al realizar la desconvolución se determinó que estaba constituida únicamente por hebras beta (44.6%) y no contenía hélices (figura 26). Este resultado nos indica que el plegamiento de esta amilasa es totalmente diferente al de las α -amilasas reportadas a la fecha, que poseen el clásico barril tipo TIM [63]. Incluso se ha reportado que las hélices α juegan un papel importante para la actividad y estabilidad de las α -amilasas [64].

También, se quiso estudiar el efecto producido por iones en la estructura de *McAmy*. Para garantizar que la enzima estuviera ausente de cualquier ion en su estructura, se pasó por una resina quelatante, después se le adicionó a una muestra Ca^{2+} y a otra Zn^{2+} (estos iones tienen un rol importante en la estructura de muchas amilasas [65]). Estos iones se usaron a una concentración final de 5 mM en los ensayos de DC. El contenido de estructura secundaria de las tres condiciones (con Ca^{2+} , Zn^{2+} y libre de iones) mostraron casi el mismo contenido de estructura secundaria con pequeñas variaciones. Este resultado parece indicar que *McAmy* no es una metaloproteína (figura 26A).

Por otro lado, se quiso confirmar la estabilidad estructural de la enzima, ya que por la técnica de DSF no se observó señal de fluorescencia en el fluorograma. La ventaja de DC es que se pueden observar los cambios estructurales a través de los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano, antes y después del barrido de temperatura, permitiendo evaluar los posibles cambios conformacionales. El barrido de temperatura se realizó de 25 °C a 85 °C y de 85 ° a 25 °C manteniendo fija la longitud de onda a 215 nm. Los resultados mostraron que *McAmy* no se desnaturalizó en el intervalo de temperatura aplicado, ya que la señal de 25 °C a 85 °C se superpone a la señal de 85 ° a 25 °C (figura 26B), lo que significa que la estructura de la enzima es sumamente estable. El contenido de estructura secundaria después del barrido de temperatura se modificó ligeramente, se observó una pequeña fracción de hélice (1.2 %) y siguen predominando las hebras beta antiparalelas (37.4 %); figura 26C). Parece ser que estas modificaciones, por sutiles que parezcan, son de suma importancia ya que esto pudiera explicar la causa por la que *McAmy* deja de ser totalmente funcional a los casi 60 °C (apartado 6.7).

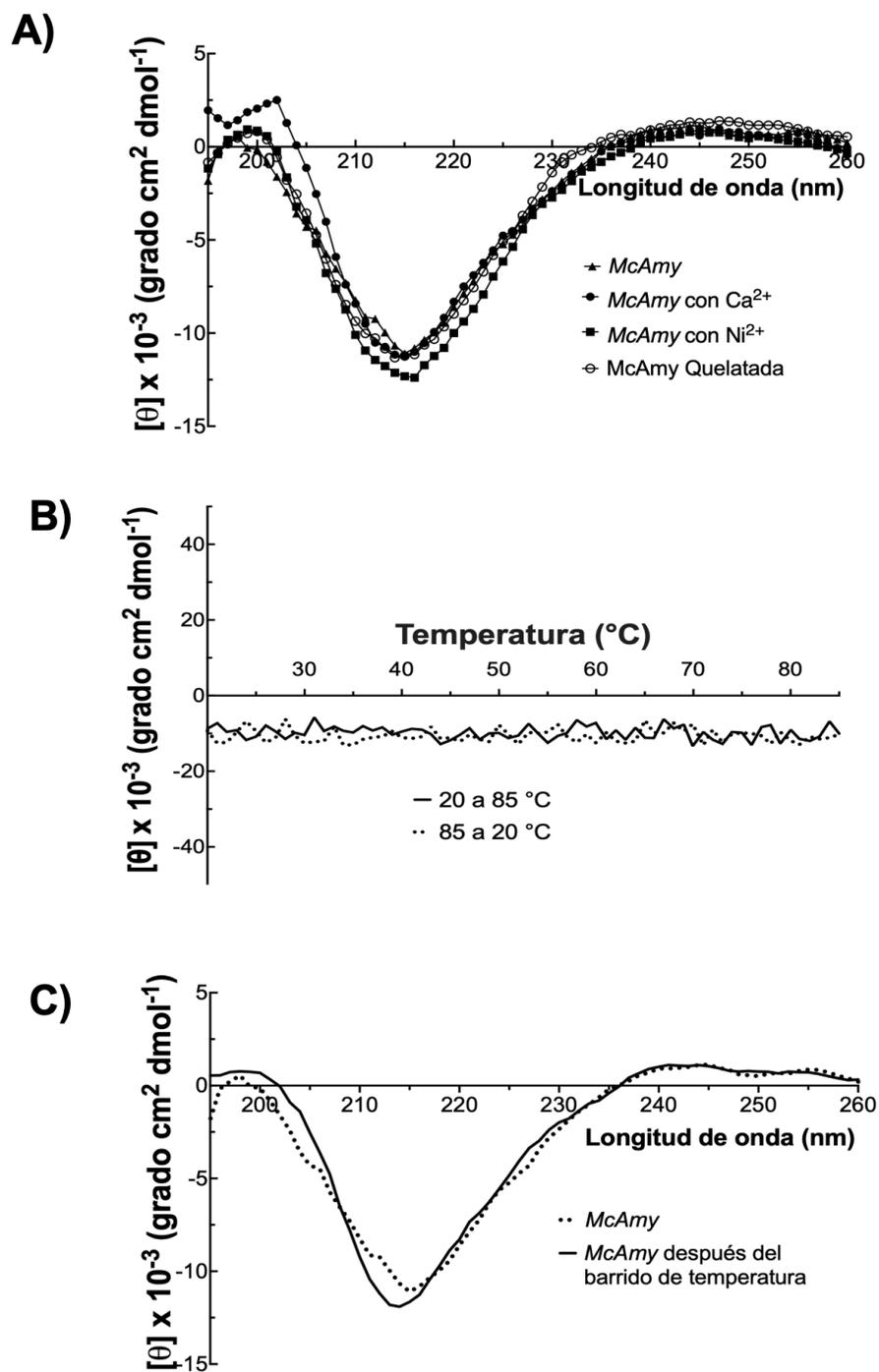


Figura 24. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de *McAmy*. A) Efecto de iones en la estructura secundaria. B) Evaluación de la estabilidad térmica de *McAmy*. Se realizó un barrido de temperatura de 20 °C a 85 °C fijando la longitud de onda a 215 nm. C) Espectros de dicroísmo circular de *McAmy* sin iones después del barrido de temperatura.

7 CONCLUSIONES.

- Se logró purificar una α -amilasa con actividad de lectina del molusco *Megathura crenulata* mediante cromatografía de afinidad usando agar y perlas de alginato como soporte de unión, siendo este último el mejor método de purificación.
- Los estudios de espectrometría de masas MALDI-TOF revelaron que *McAmy* tiene una masa molecular de 18.3 kDa siendo una de las amilasas más pequeñas reportadas a la fecha, con óptimos de actividad a pH 6 en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 NaCl 200mM y a 50 °C.
- Se comprobó que las sales amortiguadoras juegan un papel importante en la actividad enzimática, esto es, aunque las sales que constituye los amortiguadores se ajusten a un mismo pH, afectan directamente al proceso de catálisis.
- Esta enzima resultó ser independiente de Ca^{2+} , característica favorable para su aplicación industrial. Sin embargo, la actividad enzimática se incrementó en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y en presencia de aditivos, como el sorbitol y DTT. La mezcla de *McAmy* con Ca^{2+} y DTT aumentó la actividad aditivamente.
- No se logró superar, en actividad, a una α -amilasa comercial. Sin embargo, este resultado no es determinante, ya que es necesario probar más condiciones que favorezcan su actividad.
- Mediante estudios de DSF y DC se encontró que *McAmy* es estructuralmente estable, con una $T_m > 98$ °C en amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 con 150 mM de NaCl. En contraste, con los amortiguadores como citratos pH 7 y MES 6.5 donde se abatió la T_m notablemente (86.12 y 47.60 °C, respectivamente. Funcionalmente *McAmy* es estable en el intervalo de temperatura de 4 °C a 40 °C.
- Con estudios de DC en el UV lejano se determinó el contenido de estructura secundaria de *McAmy*, la cual contiene 0 % de hélices, 44.6 % de hebras β antiparalelas y 13.6 % de giros que resultó muy diferente a la de otras amilasas reportadas a la fecha, lo que rompe el paradigma de que todas las amilasas necesitan un plegamiento tipo barril TIM para el proceso enzimático.

8 BIBLIOGRAFÍA.

- [1] B. Henrissat, “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities,” *Biochem. J.*, vol. 280, no. 2, pp. 309–316, Dec. 1991, doi: 10.1042/bj2800309.
- [2] P. J. Butterworth, F. J. Warren, and P. R. Ellis, “Human α -amylase and starch digestion: an interesting marriage,” *Starch*, vol. 63, no. 7, pp. 395–405, Jul. 2011, doi: 10.1002/star.201000150.
- [3] Š. Janeček, B. Svensson, and E. A. MacGregor, “A remote but significant sequence homology between glycoside hydrolase clan GH-H and family GH31,” *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 7, pp. 1261–1268, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.036.
- [4] D. Mehta and T. Satyanarayana, “Bacterial and archaeal α -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1129, Jul. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01129.
- [5] H. Taniguchi and Y. Honnda, “Amylases,” in *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed., Academic Press, 2009, pp. 159–173.
- [6] V. K. Khlestkin, S. E. Peltek, and N. A. Kolchanov, “Review of direct chemical and biochemical transformations of starch,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 460–476, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.
- [7] Q. Zhang, Y. Han, and H. Xiao, “Microbial α -amylase: a biomolecular overview,” *Process Biochem.*, vol. 53, pp. 88–101, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2016.11.012.
- [8] K. Dumorné and R. Severe, “Marine enzymes and their industrial and biotechnological applications,” *Minerva Biotechnol.*, vol. 30, no. 4, pp. 113–119, Dec. 2018, doi: 10.23736/S1120-4826.18.02442-4.
- [9] M. V. Busi, J. Barchiesi, M. Martín, and D. F. Gomez-Casati, “Starch metabolism

in green algae,” *Starch*, vol. 66, no. 1–2, pp. 28–40, Jan. 2014, doi: 10.1002/star.201200211.

- [10] R. Sindhu, P. Binod, and A. Pandey, “ α -amylases,” in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 1st ed., Elsevier, 2017, pp. 3–24.
- [11] S. C. B. Gopinath, P. Anbu, M. K. M. Arshad, T. Lakshmi priya, C. H. Voon, U. Hashim, and S. V. Chinni, “Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, pp. 1–9, Feb. 2017, doi: 10.1155/2017/1272193.
- [12] “Global industrial enzymes market: forecast to 2024,” *Focus Surfactants*, vol. 2018, no. 10, p. 4, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.fos.2018.10.010.
- [13] B. Henrissat and A. Romeu, “Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases,” *Biochem. J.*, vol. 311, no. 1, pp. 350–351, Oct. 1995, doi: 10.1042/bj3110350.
- [14] Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada, and M. Kakudo, “Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A,” *J. Biochem.*, vol. 95, no. 3, pp. 697–702, 1984, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134659.
- [15] Q. Zhang, Y. Han, H. Xiao, R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami, and B. Chauhan, “Microbial α -amylase: A biomolecular overview,” *Process Biochem.*, vol. 53, no. 11, pp. 1599–1616, 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2016.11.012.
- [16] R. Das and A. M. Kayastha, “ β -amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nano-structures,” in *Biocatalysis*, 1st ed., Switzerland: Springer International Publishing, 2019, pp. 17–38.
- [17] C. G. Cheong, S. H. Eom, C. Chang, D. H. Shin, H. K. Song, K. Min, J. H. Moon, K. K. Kim, K. Y. Hwang, and S. W. Suh, “Crystallization, molecular replacement solution, and refinement of tetrameric β -amylase from sweet potato,” *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 21, no. 2, pp. 105–117, Feb. 1995, doi:

10.1002/prot.340210204.

- [18] M. Rejzek, C. E. Stevenson, A. M. Southard, D. Stanley, K. Denyer, A. M. Smith, M. J. Naldrett, D. M. Lawson, and R. A. Field, “Chemical genetics and cereal starch metabolism: structural basis of the non-covalent and covalent inhibition of barley β -amylase,” *Mol. BioSyst.*, vol. 7, no. 3, pp. 718–730, Mar. 2011, doi: 10.1039/C0MB00204F.
- [19] G. Hofer, S. Wieser, M. K. Bogdos, P. Gattinger, R. Nakamura, M. Ebisawa, M. Mäkelä, N. Papadopoulos, R. Valenta, and W. Keller, “Three-dimensional structure of the wheat β -amylase Tri a 17, a clinically relevant food allergen.,” *Allergy*, vol. 74, no. 5, pp. 1009–1013, May 2019, doi: 10.1111/all.13696.
- [20] Y.-N. Kang, M. Adachi, S. Utsumi, and B. Mikami, “The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean beta-amylase.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 339, no. 5, pp. 1129–40, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.029.
- [21] B. Mikami, M. Adachi, T. Kage, E. Sarikaya, T. Nanmori, R. Shinke, and S. Utsumi, “Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* beta-amylase complexed with maltose.,” *Biochemistry*, vol. 38, no. 22, pp. 7050–61, Jun. 1999, doi: 10.1021/bi9829377.
- [22] C. Roth, O. V. Moroz, A. Ariza, L. K. Skov, K. Ayabe, G. J. Davies, and K. S. Wilson, “Structural insight into industrially relevant glucoamylases: flexible positions of starch-binding domains,” *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, vol. 74, no. 5, pp. 463–470, May 2018, doi: 10.1107/S2059798318004989.
- [23] G. Davies and B. Henrissat, “Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases,” *Structure*, vol. 3, no. 9, pp. 853–859, Sep. 1995, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- [24] A. Ardèvol and C. Rovira, “Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Insights from ab initio quantum mechanics/molecular mechanics dynamic simulations,” *J. Am. Chem.*

Soc., vol. 137, no. 24, pp. 7528–7547, Jun. 2015, doi: 10.1021/jacs.5b01156.

- [25] B. Jia, G. W. Cheong, and S. Zhang, “Multifunctional enzymes in archaea: Promiscuity and moonlight,” *Extremophiles*, vol. 17, no. 2, pp. 193–203, Mar-2013, doi: 10.1007/s00792-012-0509-1.
- [26] B. Su, Z. Qian, T. Li, Y. Zhou, and A. Wong, “PlantMP: a database for moonlighting plant proteins,” *Database*, vol. 2019, Jan. 2019, doi: 10.1093/database/baz050.
- [27] D. H. E. W. Huberts and I. J. van der Klei, “Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1803, no. 4, pp. 520–525, Apr-2010, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.
- [28] M. N. Gupta, S. Pandey, N. Z. Ehtesham, and S. E. Hasnain, “Medical implications of protein moonlighting,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 149, no. 3, pp. 322–325, Mar. 2019, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2192_18.
- [29] C. J. Jeffery, “Moonlighting proteins,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 8–11, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0968-0004(98)01335-8.
- [30] L. Franco-Serrano, S. Hernández, A. Calvo, M. A. Severi, G. Ferragut, J. A. Pérez-Pons, J. Pinõl, Ò. Pich, Á. Mozo-Villarias, I. Amela, E. Querol, and J. Cedano, “MultitaskProtDB-II: an update of a database of multitasking/moonlighting proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D645–D648, Jan. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1066.
- [31] A. Quintero Martinez, “Purificación y caracterización fisicoquímica y estructural de una lectina de la hemolinfa de *Megathura crenulata* (Mollusca: Gastropoda),” UNAM, Facultad de Ciencias, Distrito Federal., 2006.
- [32] A. Mazariegos-Villarreal, A. Piñón-Gimate, F. Aguilar-Mora, M. Medina, and E. Serviere-Zaragoza, “Diet of the Keyhole Limpet *Megathura crenulata* (Mollusca: Gastropoda) in Subtropical Rocky Reefs,” *J. Shellfish Res.*, vol. 32, no. 2, pp. 297–303, Aug. 2013, doi: 10.2983/035.032.0208.

- [33] J. . Harris and J. Markl, "Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review," *Micron*, vol. 30, no. 6, pp. 597–623, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0968-4328(99)00036-0.
- [34] J. Suriya, S. Bharathiraja, M. Krishnan, P. Manivasagan, and S. K. Kim, "Marine Microbial Amylases: Properties and Applications," in *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st ed., vol. 79, Elsevier Inc., 2016, pp. 161–177.
- [35] P. Tomasik, "Enzymatic conversions of starch," *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, vol. 68, pp. 59–436, Jan. 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4.
- [36] A. Homaei, M. Ghanbarzadeh, and F. Monsef, "Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 83, pp. 306–314, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.080.
- [37] C. Nikapitiya, C. Oh, I. Whang, C.-G. Kim, Y.-H. Lee, S.-J. Kim, and J. Lee, "Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α -amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus*," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 152, no. 3, pp. 271–281, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.CBPB.2008.12.007.
- [38] U. Sabapathy and L. H. Teo, "A kinetic study of the α -amylase from the digestive gland of *Perna viridis* L.," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 101, no. 1–2, pp. 73–77, Jan. 1992, doi: 10.1016/0305-0491(92)90160-S.
- [39] Y. Kumagai, T. Satoh, A. Inoue, and T. Ojima, "Enzymatic properties and primary structures of two α -amylase isozymes from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 164, no. 2, pp. 80–88, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.CBPB.2012.11.001.
- [40] M. Lombraña, P. Suárez, and F. San Juan, "Two forms of α -amylase in mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: Purification and molecular properties of form II," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 142, no. 1, pp. 56–

66, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.CBPC.2005.05.017.

- [41] E. García-Maldonado, P. Cano-Sánchez, and A. Hernández-Santoyo, “Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 66, pp. 564–574, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.057.
- [42] D. S. J. Ignacio, “Caracterización bioquímica y estructural de una amilasa de la lapa marina (*megathura crenulata*),” UNAM, 2015.
- [43] M. Sardar and M. N. Gupta, “Alginate beads as an affinity material for alpha amylases,” *Bioseparation*, vol. 7, no. 3, pp. 159–165, 1998, doi: 10.1023/A:1008065501149.
- [44] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, and D. C. Klenk, “Measurement of protein using bicinchoninic acid,” *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, Oct. 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [45] D. J. Harvey, “Mass Spectrometry: (1) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI),” in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018.
- [46] G. L. Miller, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,” *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, Mar. 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [47] Y. Zhu, J. Zajicek, and A. S. Serianni, “Acyclic Forms of [1- ¹³ C]Aldohexoses in Aqueous Solution: Quantitation by ¹³ C NMR and Deuterium Isotope Effects on Tautomeric Equilibria,” *J. Org. Chem.*, vol. 66, no. 19, pp. 6244–6251, Sep. 2001, doi: 10.1021/jo010541m.
- [48] H. T. S. Britton and R. A. Robinson, “CXC VIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal,” *J. Chem. Soc.*, vol. 0, no. 0, pp. 1456–1462,

Jan. 1931, doi: 10.1039/JR9310001456.

- [49] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, and F. R. Salemme, “High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery,” *J. Biomol. Screen.*, vol. 6, no. 6, pp. 429–440, Dec. 2001, doi: 10.1177/108705710100600609.
- [50] F. J. Sorrell, G. K. Greenwood, K. Birchall, and B. Chen, “Development of a differential scanning fluorimetry based high throughput screening assay for the discovery of affinity binders against an anthrax protein,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 52, no. 5, pp. 802–808, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.JPBA.2010.02.024.
- [51] S. Boivin, S. Kozak, and R. Meijers, “Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 91, no. 2, pp. 192–206, 2013, doi: 10.1016/j.pep.2013.08.002.
- [52] U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. DeTitta, N. Dekker, and P. Nordlund, “Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies,” *Anal. Biochem.*, vol. 357, no. 2, pp. 289–298, Oct. 2006, doi: 10.1016/J.AB.2006.07.027.
- [53] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, “How to study proteins by circular dichroism,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1751, no. 2, pp. 119–139, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.BBAPAP.2005.06.005.
- [54] N. J. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, Jan. 2007, doi: 10.1038/nprot.2006.202.
- [55] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, and J. Kardos, “BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W315–W322, Jul. 2018, doi:

10.1093/nar/gky497.

- [56] Febriani, Rayyana, M. Ulya, F. Oesman, Akhmaloka, and T. M. Iqbalsyah, "Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov.," *Heliyon*, vol. 5, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02171.
- [57] H. Zhuo, F. Payan, and M. Qian, "Crystal structure of the pig pancreatic α -amylase complexed with *p*-nitrophenyl- α -D-maltoside-flexibility in the active site," *Protein J.*, vol. 23, no. 6, pp. 379–387, Aug. 2004, doi: 10.1023/B:JOPC.0000039552.94529.95.
- [58] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami, and B. Chauhan, "Microbial α -amylases: A biotechnological perspective," *Process Biochem.*, vol. 38, no. 11, pp. 1599–1616, 2003, doi: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- [59] S. O. Ugwu, S. O. Ugwu, S. P. Apte, S. O. Ugwu, O. B. Iv, and S. P. Apte, "The effect of buffers on protein conformational stability," *PHARM. TECHNOL*, pp. 86–113.
- [60] N. Aghajari, G. Feller, C. Gerday, and R. Haser, "Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor.," *Protein Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 564–72, Mar. 1998, doi: 10.1002/pro.5560070304.
- [61] H. L. Liu, W. J. Chen, and S. N. Chou, "Mechanisms of aggregation of alpha- and beta-amylases in aqueous dispersions," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 28, no. 2–3, pp. 215–225, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0927-7765(02)00142-X.
- [62] G. D. Haki and S. K. Rakshit, "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review," *Bioresour. Technol.*, vol. 89, no. 1, pp. 17–34, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.
- [63] B. A. Kikani and S. P. Singh, "Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy," *Int. J. Biol.*

Macromol., vol. 81, pp. 450–460, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.08.032.

- [64] J. L. Uma Maheswar Rao and T. Satyanarayana, “Biophysical and biochemical characterization of a hyperthermostable and Ca²⁺-independent α -amylase of an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 150, no. 2, pp. 205–219, Aug. 2008, doi: 10.1007/s12010-008-8171-x.
- [65] H. Yin, Z. Yang, X. Nie, S. Li, X. Sun, C. Gao, Z. Wang, G. Zhou, P. Xu, and C. Yang, “Functional and cooperative stabilization of a two-metal (Ca, Zn) center in α -amylase derived from Flavobacteriaceae species,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17933, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-18085-4.