



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL DOMINIO DE FIJACIÓN AL
ALMIDÓN DE α -AMILASA, DE *Lactobacillus amylovorus*"**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA
PRESENTA
MONSERRAT SANTIAGO GONZÁLEZ**

Directora de tesis: Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM



México, D. F.

2004



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

Dr. Ignacio Peñadosa Castro
Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Dr. Sergio Vaca Pacheco
Dr. Diego Arenas Aranda
M. en C. Irma Dueñas García

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Industrial, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Romina Rodríguez Sanoja.

Agradecimientos:

A CONACyT por el apoyo al proyecto 41222-Z y la beca otorgada.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por haber contribuido en mi formación como profesional. Así como su interés e impulso para transmitir sus conocimientos.

A la Mtra. Beatriz Ruiz Villafón por la contribución y las propuestas de trabajo, además de su infinita atención.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su gran hospitalidad y recomendaciones.

A el Biol. Rafael Cervantes Saavedra por los consejos y la ayuda en la realización de este trabajo.

A Larissa Linares Castro y Daniel Guillen Santos por compartir sus enseñanzas en todo momento, por su motivación y amistad a lo largo de todo este tiempo.

A la Biol. Silvia Guzmán Beltrán, Nadinne Mascareñas Ruiz por haber hecho de este espacio algo más agradable, por su compañía y apoyo.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por su tiempo y espacio dedicado para darme un buen consejo.

A mis papás por el cariño, el apoyo incondicional y la confianza que siempre me han concedido. Asimismo, les agradezco por ser un ejemplo de entrega y perseverancia.

A mis hermanas Verónica y Elisa por estar conmigo en todo momento.

A Mariana Castillo Vellanoweth, Patricia Meza Cervantes, Sandra Mote Herrera, Marco Antonio Sánchez Guerra, Abraham Rosas Arellano, Rafael Lara Resendiz, Diego Ortega Capitaine, Mauricio Herrera Cuadra, Mýela Cháidez García, Daniel García, Génesis Reynoso Herrera, Claudio Noria Melgoza, Cristian Colín Santana, Aníbal Díaz de la Vega y Angel Piña Osorio por su amistad y grata compañía a lo largo de la carrera.

INDICE

	Página
I. Resumen	1
Lista de abreviaciones	2
II. Introducción	3
III. Justificación	6
IV. Antecedentes	7
1. Bacterias lácticas (BL)	
1.1. Metabolismo de bacterias lácticas	
1.2. Las bacterias lácticas en fermentaciones vegetales	
2. Almidón	
3. Amilasas	
3.1 α -amilasas	
3.2. Estructura	
4. Dominios de fijación a carbohidratos	
4.1. Dominios de fijación al almidón	
5 Amilasas de bacterias lácticas	
V. Hipótesis	18
VI. Objetivos	18
VII. Materiales y métodos	19
VIII. Resultados	26
IX. Discusión	39
X. Conclusión	43
XI. Bibliografía	44
XII. Apéndices	50

RESUMEN

La α -amilasa (AmyA) de *Lactobacillus amylovorus* presenta una estructura primaria inusual, constituida por dos dominios funcionales: uno catálítico (aminoácidos 1 al 474) y otro carboxilo-terminal (aminoácidos 475 al 953). El dominio catálítico es semejante al de otras α -amilasas de bacterias Gram-positivas, conteniendo las regiones reportadas como conservadas en estas enzimas. El dominio carboxilo-terminal, que le confiere la capacidad de fijación al almidón insoluble, es estructuralmente diferente al observado en otras amilasas ya que, a diferencia de ellas, se encuentra constituido por cinco unidades repetidas (UR), idénticas e idénticas de 91 aminoácidos cada una.

Con la finalidad de conocer si las 5 UR aisladas del sitio catálítico constituyen un dominio de fijación al almidón o bien si cada módulo aislado es funcional, se decidió comparar la capacidad de adsorción de 1 UR contra la de las 5 que forman el dominio, donándolas y expresándolas de manera heteróloga.

Los ensayos de adsorción al sustrato mostraron que 1 UR sí es capaz de adsorberse al gránulo de almidón. Al comparar la adsorción de 1 UR con la amilasa entera se observó que esta última presenta una K_{ad} tres veces mayor, lo que sugiere que conforme aumenta el número de UR aumenta también la capacidad de adsorción. Al comparar contra la adsorción de las 5 UR, se observa que toda la proteína es adsorbida obteniendo una K_{ad} de 1, que es más grande que la de 1 UR e incluso mayor que la de la amilasa entera, lo que confirma por un lado, que existe un efecto sumatorio o sinérgico entre las unidades y sugiere por el otro, un efecto estérico del dominio catálítico que no permite la interacción de las 5 UR con el sustrato.

Estos resultados indican que cada UR está actuando como un módulo independiente de fijación, lo que se ha observado en enzimas con múltiples dominios de adsorción como celulasas y xilanasas pero nunca en amilasas.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas tienen como característica distintiva la capacidad de producir ácido láctico como producto único o mayoritario de su metabolismo (Desmazeud, *et al.*, 1994). Este grupo comprende un gran número de especies que ocupan muy diversos nichos ecológicos en la naturaleza, se encuentran en la superficie de las plantas, en ensilajes y en diversos productos naturalmente fermentados, además de ser comensales de vertebrados (tracto gastrointestinal, cavidad bucal, tracto urogenital) sobre los cuales ejercen diferentes efectos benéficos como la protección contra ciertos cánceres (Hiramaya and Rafter, 2000), el control de patógenos de la microflora intestinal (Shu *et al.*, 2000), vaginal (Oxman *et al.*, 2000) y la estimulación del sistema inmune (Perdigón *et al.*, 1999).

Las bacterias lácticas han sido tradicionalmente utilizadas para la producción de alimentos fermentados y son conocidas básicamente por su importancia en la industria lechera, en el ensilaje, en la conservación de carnes y en la panificación. Dichas bacterias permiten la conservación de los alimentos, ya que, al acidificar el medio, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. Por otro lado, la fermentación láctica mejora la calidad nutricional de los alimentos al poner en disposición diferentes vitaminas, minerales y proteínas, además de desintoxicar algunos compuestos antinutricionales (Steinkraus, 1996).

Se han aislado bacterias lácticas que son capaces de utilizar el almidón, como fuente de carbono, a partir de fermentaciones vegetales tradicionales, como es el caso del pozol de Tabasco (fermentación de maíz) y de otros productos fermentados de maníoca, arroz, sorgo, trigo y mijo (Steinkraus, 1996).

Para poder crecer en estos sustratos estos microorganismos producen α -amilasas. La α -amilasa es una endoenzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón, liberando cadenas de poli- y oligosacáridos de longitud variable. La dextrinización de los sustratos está acompañada por una pérdida rápida de la viscosidad.

La hidrólisis prolongada produce una mezcla de glucosa, maltosa y maltotriosa (Winkelmann, 1992).

Actualmente se ha descrito una docena de bacterias lácticas amilolíticas, entre ellas, sólo los genes *amyA* de *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihottivorans* han sido secuenciados. Estos genes poseen entre ellos 98% de identidad y presentan una estructura diferente a las reportadas para cualquier otra amilasa (procariota o eucariota) (Giraud and Cuny, 1997; Morlon-Guyot *et al.*, 2001).

En la α -amilasa de *L. amylovorus* se han observado dos dominios funcionales: un dominio catalítico (aminoácidos 1 al 474) y un dominio carboxilo-terminal (aminoácidos 475 al 953). El dominio catalítico contiene las regiones descritas por Vihinen y Mäntsä (1989) y Janecek y Sevik (1999) como conservadas en todas las amilasas. Su funcionalidad fue establecida al transferir los primeros 410 aminoácidos de esta enzima a una cepa no amilolítica de *L. plantarum* y conferirle entonces la capacidad de hidrolizar el almidón soluble (Jore and DeParasis, 1993).

La singularidad de estas amilasas se encuentra en el dominio carboxilo-terminal, ya que a diferencia de las otras α -amilasas se encuentra constituido por unidades repetidas, directas e idénticas, cuyo número depende de la especie, 4 para *L. plantarum* y *L. manihottivorans* y 5 para *L. amylovorus*. El papel de estas secuencias se estudió utilizando 2 donas, la primera con la amilasa entera de *L. amylovorus* y la segunda con la amilasa truncada, donde las unidades repetidas habían sido eliminadas. El análisis de las características bioquímicas de las amilasas resultantes mostró que la amilasa truncada ya no es capaz ni de hidrolizar, ni de fijarse al almidón insoluble, lo que confirmó la existencia de un dominio de fijación al sustrato independiente del dominio catalítico (Rodríguez-Sanaja *et al.*, 2000).

El dominio de fijación al almidón (DFA) se puede encontrar en las α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas y ciclodextrin-glicosiltransferasas en donde ocupa generalmente el extremo carboxilo-terminal de la enzima, sin embargo no existe en todos los miembros

de cada familia (Janecek, 2002). Dicho DFA está formado por una centena de aminoácidos, a diferencia del de las bacterias lácticas mencionadas que tiene aproximadamente quinientos. Sin embargo, cuando se alinean una de las unidades repetidas con el DFA de otras amilasas se observa que se conservan aminoácidos, que se han identificado como importantes en la fijación al sustrato, lo que sugiere que cada unidad repetida puede ser un módulo independiente.

El objetivo principal de este trabajo fue el determinar si las UR aisladas del dominio catiónico son funcionalmente activas y de ser así, establecer si constituyen un dominio o módulos separados cuya función en la fijación pueda ser sumatoria.

JU STIFICACIÓN

Caracterizar este nuevo tipo de amilasas es de gran interés, ya que poseen una estructura diferente a la de cualquier otra amilasa reportada. Además, estos estudios pueden tener aplicación dentro de la biología molecular en el diseño de vectores de expresión que puedan utilizar este dominio de fijación como tallo de purificación de proteínas recombinantes, usando el almidón insoluble como soporte, o bien aplicarse en la inmovilización de proteínas que se empleen sistemas controlados de adsorción o liberación de moléculas o ligandos importantes en la industria alimentaria, farmacéutica y de biorremediación.

ANTECEDENTES

1. Bacterias Lácticas (BL)

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas, muy heterogéneo, se caracterizan por ser no esporuladas, microaerófilas, carecer de catalasa, nitrato reductasa y citocromo oxidasa. Son microorganismos capaces de fermentar los carbohidratos hasta ácido láctico ((D (-), L (+) o DL)). Los géneros que se incluyen en este grupo son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Atopobium* y *Carnobacterium*. También las bifidobacterias, aunque lejanas taxonómicamente son consideradas dentro de este grupo (Kandler, 1983).

Muchas de estas bacterias están asociadas con la producción tradicional o industrial de alimentos fermentados. Además, algunas bacterias lácticas son explotadas como productoras de enzimas que dan aroma, péptidos con actividad antimicrobiana, o metabolitos que contribuyen al aroma, conservación y textura de los alimentos (de Vos, 1999; Demeter and Elbertzhagen, 1971).

1.1 Metabolismo de Bacterias Lácticas

El crecimiento de las bacterias lácticas depende principalmente de la fosforilación de los productos intermediarios provenientes del catabolismo de carbohidratos y de la eficiencia con la que transportan estos productos. Según la especie bacteriana y las condiciones de cultivo, las bacterias lácticas pueden seguir una vía homofermentativa o una vía heterofermentativa:

- ❖ Las bacterias lácticas homofermentativas siguen la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) en donde el ácido láctico es el producto mayoritario del metabolismo.
- ❖ Las bacterias lácticas heterofermentativas siguen la vía de Pentosas-fosfatos que proporciona además de ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético o, en algunos casos, etanol.

El balance energético de los diferentes vías es el siguiente (Borch *et al.*, 1991):

- ♣ 1 glucosa + 2 Pi + 2 ADP → vía homofermentativa → 2 lactato + 2 ATP
- ♣ 1 glucosa + 1 Pi + 1 ADP → vía heterofermentativa → 1 lactato + 1 CO₂ + 1 acetato o 1 etanol + 1 ATP

La degradación de glucosa permite la síntesis de una o dos moléculas de ATP, mientras que la vía oxidativa provee de 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa degradada. La energía directamente disponible de la fermentación láctica es relativamente poca, lo que lleva a un rendimiento de biomasa/sustrato escaso (Giraud, 1993).

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos particularmente exigentes, ya que requieren de la presencia de un azúcar fermentable, varios aminoácidos, vitaminas y de un sistema tampón capaz de neutralizar las cantidades elevadas de ácidos producidos durante su crecimiento.

1.2 Las bacterias lácticas en fermentaciones vegetales

En muchos países, las plantas ricas en almidón son transformadas y conservadas por fermentación láctica, ya que la acidificación causada por el ácido láctico, la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno, permiten la preservación de los alimentos fermentados al inhibir el crecimiento de flora patógena y de los microorganismos responsables de alterar la calidad de los alimentos (Streinkraus, 1996). Además, este tipo de fermentación mejora las propiedades nutricionales de los productos, aumentando la digestibilidad de ciertas proteínas, la disponibilidad de algunos aminoácidos, azúcares, vitaminas del grupo B y mejorando las propiedades organolépticas de los alimentos (De Vuyst and Vandamme, 1994).

En los últimos años se han aislado bacterias lácticas amilolíticas de muy diferentes hábitats: a partir de desperdicios de maíz en USA (*Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus*) (Nakamura and Crowell 1979; Nakamura 1981), de raíz de yuca fermentada en el Congo y Nigeria (cepas de *Lactobacillus plantarum*) (Giraud *et*

d., 1991), de ensilaje de pescado en Suecia (cepas de *Leuconostoc* spp) (Lindgren and Refai, 1984), de pescado y arroz fermentado en Japón (*Lactobacillus plantarum*) (Olympia *et al.*, 1995), de masa de maíz fermentada en Benin (*Lactobacillus fermentum*) (Agati *et al.*, 1998) y de yuca agria en Colombia (*Lactobacillus manihotivorans*) (Morlon-Guyot *et al.*, 1998). Todas estas bacterias lácticas producen ácido láctico por la degradación del almidón presente en este tipo de alimentos.

2. Almidón

El almidón es el carbohidrato de reserva de las plantas vasculares, está compuesto de una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polisacárido lineal con una longitud promedio de 1000 unidades de α -D-glucosa unidas por enlaces α -1,4. La amilopectina es una molécula ramificada formada por cadenas cortas de amilosa (10-60 unidades de glucosa) unidas por enlaces α -1,6. La fuente de almidón determina el contenido relativo de amilosa y amilopectina. Por otra parte la proporción de ramificación es una propiedad importante del sustrato debido a que las enzimas hidrolizan los diferentes sustratos con especificidades diferentes (Vihinen and Mäntsä, 1989; van der Maarel *et al.*, 2002).

Las moléculas de amilosa se organizan en el espacio formando hélices huecas, las cuales pueden torcerse entre sí formando dobles hélices o pueden juntarse en paquetes sin entrelazarse, dependiendo de la extensión relativa de las hélices (Warren, 1996).

Los gránulos de almidón están organizados en regiones amorfas y cristalinas, las regiones cristalinas están únicamente compuestas de amilopectina, mientras que la amilosa está presente en las regiones amorfas. Las moléculas se encuentran orientadas de manera radial en el gránulo de almidón y conforme aumentan los residuos también el número de ramificaciones para llenar el espacio, con la subsiguiente formación de regiones concéntricas de estructura amorfa o cristalina (van der Maarel *et al.*, 2002).

3. Amilasas

Las amilasas son ampliamente utilizadas en numerosos procesos dentro de la industria de los alimentos, bebidas, fermentaciones, textiles, farmacéutica y del papel (Sarıkaya *et al.*, 2000). La α -amilasa es una enzima clave dentro de la industria de la transformación del almidón, en donde, en asociación con la glucoamilasa, hidroliza el almidón de maíz para la producción de jarabes de glucosa y fructuosa. Las amilasas son usadas también en la síntesis química de oligosacáridos por transglucosilación (Sabo-Rincón *et al.*, 1999).

En general las amilasas, hidrolizan los enlaces α -glucosídicos del almidón y son producidas por plantas, animales y microorganismos. Por su acción estas enzimas pueden dividirse en dos categorías: las endoenzimas, como las α -amilasas, que rompen el azar los enlaces al interior de la molécula de almidón liberando oligosacáridos lineales y ramificados; y las exoenzimas (β -amilasas, glucoamilasas y α -glucosidasas), que hidrolizan a partir del extremo no reductor, produciendo oligo- y/o monosacáridos. Por otra parte las amilasas pueden dividirse de acuerdo a los enlaces que son capaces de degradar, α -1,4 o α -1,6. Por ejemplo: las glucoamilasas y las alodextrin-glucoamiltransferasas atacan sólo los enlaces α -1,4, mientras que las pululanasas tipo I, específicamente hidrolizan los enlaces α -1,6 en pululano y en oligosacáridos ramificados. (Vihinen and Mönstsdä, 1989; Niehaus *et al.*, 1999).

En base a su estructura primaria las amilasas han sido clasificadas dentro de la familia 13 de las glucosil-hidrolasas (GH) (Henrissat, 1991; <http://cmb.nrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>). Esta familia comprende enzimas con 28 diferentes especificidades entre las cuales se encuentran glucosidasas, transglucosidasas e isomerasas. Hasta el momento sólo 13 especificidades están representadas por estructuras cristalinas. Los miembros de esta familia comparten una estructura en barril $(\beta/\alpha)_8$, la capacidad de hidrolizar enlaces glucosídicos α -1,4 manteniendo la conformación del carbono α -anomérico y además conservan algunas regiones con aminoácidos similares. Cada enzima tiene un ácido glutámico y dos residuos de ácido aspártico como aminoácidos catalíticos (MacGregor *et al.*, 2000; Svensson *et al.*, 2002).

3.1 α -Amilosas

La α -amilasa (1,4- α -D-glucano gluconohidrolasa) es una endoenzima que cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4-glucosídicos en almidón, glucógeno y varios oligosacáridos, liberando productos α -anoméricos (Kagawa *et al.*, 2003).

3.2. Estructura

La comparación de aminoácidos de diferentes α -amilosas (animales, plantas y bacterias), muestra que entre las secuencias de las amilosas no hay más del 10% de similitud (Nakajima *et al.*, 1986), sin embargo todas ellas conservan una estructura común formada por múltiples dominios. El dominio A es el dominio catalítico, presenta una estructura en barril (β/α)₈, es decir, compuesto por 8 láminas β paralelas, dispuestas las unas contra las otras como las paredes de un barril. Las α -hélices unen a las láminas y se encuentran localizadas al exterior del barril, de manera que se tienen ocho unidades (β/α) en un barril regular (β/α)₈. El dominio B se inserta entre la tercera lámina β y la tercera hélice α y forma, con el dominio A, la bolsa del sitio activo. El dominio C sigue al barril catalítico (β/α)₈, y se organiza en una estructura en barril distorsionado formado por láminas- β antiparalelas (estructura β -sándwich); se cree que estabiliza el dominio catalítico (A), al proteger a los residuos hidrofóbicos del solvente (**Fig. 1**) (MacGregor *et al.*, 2000).

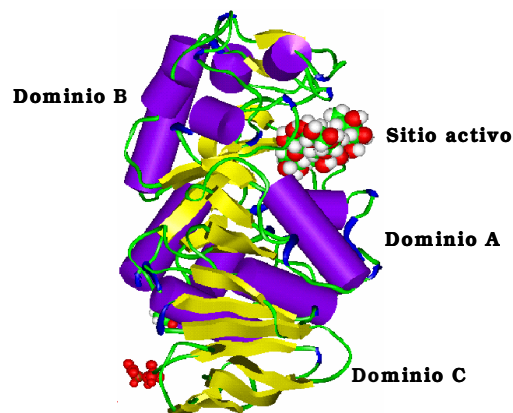


Fig. 1. Estructura tridimensional de la α -amilasa de *Bacillus subtilis*.

Los dominios A y B de todas las α -amilasas contienen cuatro regiones conservadas. Utilizando como modelo la α -amilasa de *Bacillus subtilis* las regiones conservadas son: región I, localizada en la tercera lámina β 3 (residuos 107 d 112: DAVINH), región II en β 4 (residuos 181 d 190: GFRFDAAKH), región III en β 5 (residuos 207 d 221: GEILQ) y región IV en β 7 (residuos 274 d 279: WVESHQ) (Vihinen and Mäntsä, 1989).

Algunas de las enzimas de la familia 13 contienen uno o dos dominios adicionales, el dominio D y el dominio E, ambos se encuentran en el extremo carboxilo-terminal, después del dominio C. El dominio D tiene una estructura formada por láminas β , está presente principalmente en transglucosidasas pero hasta el momento no se conoce su función. El dominio E está formado por una centena de aminoácidos que forman láminas β y se organizan en un barril β -distorsionado, esta estructura es la responsable de la adsorción de almidón insoluble por lo que se le designa como dominio de fijación de almidón (DFA) (Jonecek. *et al.*, 2003).

4. Dominios de fijación a carbohidratos

La presencia de los dominios de fijación en las glucosil-hidrolasas es muy frecuente, se sabe que funcionan independientemente de los dominios catalíticos y que el reconocimiento de su sustrato es extremadamente específico (Sorimachi *et al.*, 1997).

Los Módulos de fijación a carbohidratos (MFC) han sido clasificados por Henrissat en 39 familias en las que se incluyen módulos de fijación a celulosa, xilano, quitina y almidón (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/CBM.html>). Estos MFC, maximizan la actividad catalítica de la enzima al incrementar la concentración de sustrato en el sitio activo (Sorimachi *et al.*, 1997). Se ha postulado que la enzima se une al sustrato por interacciones entre los anillos del azúcar y los residuos aromáticos en la superficie del sitio de fijación de la proteína (Czjzek *et al.*, 2001). Se espera que la clasificación de las familias facilite la identificación de MFC con las características establecidas para cada familia, en algunos casos predecir la fijación específica y ayudar a identificar los residuos funcionales, además de revelar las relaciones evolutivas y predecir el pliegue del polipéptido.

Un ejemplo de MFC lo constituyen los dominios de fijación a celulosa, estos están ampliamente distribuidos en todas las celulasas, en algunas hemicelulasas y xilanasas, principalmente en diferentes bacterias anaeróbicas, aeróbicas y hongos (Linder and Teeri, 1997). Los dominios en hongos están formados por cerca de 35 aminoácidos de largo; mientras que los dominios en bacterias por 80-250 aminoácidos, dependiendo de la familia. En ellos se conservan aminoácidos aromáticos, especialmente triptófanos. Los DFC difieren en su afinidad por celulosa: algunos se unen a celulosa amorfa y cristalina, otros tienen afinidad por un solo tipo de celulosa. Algunos se encuentran presentes en xilanasas como en la xilanasasa D de *Cellulomonas fimi* que tiene dos dominios de fijación que claramente se unen a ligandos diferentes: uno con afinidad a xilano y otro a celulosa cristalina (Warren, 1996).

4.1 Dominio de Fijación al almidón

La más estudiada y extendida familia de DFAs es la de MFC 20. Dichos módulos se presentan en el 10% de las amilasas de origen bacteriano (Svensson *et al.*, 1989; Janecek and Sevik, 1999). Es un dominio funcional que puede adsorberse al almidón insoluble, permitiendo así a la enzima digerir el almidón granular. El DFA está presente en un gran número de enzimas amilolíticas de la familia 13 de las glucosil-hidrolasas (α -glucosidasas, di-oligodextrinasas, isoamilasas, pululanasas, oligo-1,6-glucosidasas, di-dextrin-glucosiltransferasas, amilomaltasas, amilosacarasas, enzimas ramificantes, glucanotrasferasas, exoamilasas formadoras de maltotreosas y en pocas α -amilasas). Este dominio se encuentra en glucoamilasas de hongos de la familia 15 y en algunas α -amilasas de la familia 14. El DFA se encuentra en la región carboxilo terminal de la proteína, excepto en la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* que se encuentra en el extremo amino-terminal. El DFA puede estar directamente conectado al dominio catalítico después del dominio C en las α -amilasas, después del dominio D en las di-dextrin-transferasas, o a través de una larga región O-glicosilada rica en serinas y treoninas en las glucoamilasas (Juge *et al.*, 2002). Generalmente el DFA está formado por una centena de aminoácidos produciendo varios segmentos de láminas β que forman una estructura en barril β distorsionada (Mikami, 1999).

En los dominios de fijación de almidón hay ciertos aminoácidos que interactúan con el sustrato, Sorimachi y col. 1996 propusieron dos sitios implicados en la fijación. El sitio I contiene los residuos W543, E576, K578, W590, E591, N595 y el sitio II contiene a los aminoácidos T526, Y527, G528, E529, N530, D554, Y556 y W563 (la numeración corresponde a la de los residuos de la glucamilasa de *Aspergillus niger*); el sitio I está involucrado en el reconocimiento inicial del sustrato, mientras que el sitio II es el responsable de preparar el sustrato para la catálisis, fijando la enzima a los gránulos de almidón (Penninga *et al.*, 1996). Las secuencias del DFA de varias amilasas han sido comparadas y han mostrado que los residuos de triptófano de las posiciones 543, 563 y 590 de los dominios de fijación son muy conservados (Williamson *et al.*, 1997). Siendo los residuos que intervienen directamente en la fijación al sustrato: W543, W 590 del sitio 1 y Y527, Y556 del sitio 2 (Sorimachi *et al.*, 1997).

Estos DFA actúan en conjunto con el dominio catalítico para acelerar la hidrólisis, incrementando la concentración de sustrato en el sitio activo y desestabilizando la superficie de los gránulos de almidón (Tibbot *et al.*, 2002).

5. Amilasas de bacterias lácticas

Durante el estudio de la microflora asociada a las fermentaciones vegetales, se encontraron bacterias lácticas capaces de utilizar el almidón como fuente de carbono. Hasta el momento sólo se han aislado una docena de cepas que poseen actividad amilolítica: *Streptococcus equinus*, *Streptococcus bovis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus manihotivorans* y *Lactobacillus fermentum*. Las amilasas de cinco de entre ellas han sido más o menos caracterizadas (Agati *et al.*, 1998; Sen and Chakraborty, 1984; Aguilar *et al.*, 2000; Giraud *et al.*, 1993; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000). Todas muestran actividad óptima a pHs cercanos a 5, una gran tolerancia a pH ácidos y una temperatura óptima alrededor de 60-65°C; estas enzimas pueden actuar a temperaturas de hasta 70°C. Por ello es de gran interés industrial y genético la caracterización de sus actividades

enzimáticas, ya que estas son capaces de degradar sustratos insolubles, aspecto fisiológico poco estudiado en bacterias lácticas.

A principios de los 90's Giraud y col (1994) e Imam y col (1991) observaron que las α -amilasas de *L. amylovorus* y *L. plantarum* eran capaces de hidrolizar el almidón insoluble, lo que motivó profundizar en su estudio. Así, los genes que codifican las α -amilasas de tres lactobacilos (*L. plantarum*, *L. manihotivorus* y *L. amylovorus*) fueron secuenciados (Giraud and Cuny, 1997, Morlon-Guyot, *et al.*, 2001).

Estos genes comparten una alta identidad (98%), presentan un tamaño del doble del usualmente observado en amilasas (100kDa vs. 50-60kDa) y una estructura particular que puede ser dividida en dos partes (**Figura 2**):

1. La primera mitad de estos genes contiene los elementos normales de un promotor de lactobacilos y codifica para el dominio catalítico de la enzima. Su funcionalidad fue demostrada al transferir la actividad amilolítica a una cepa no amilolítica de *Lactobacillus plantarum*, con sólo los primeros 410 aminoácidos de α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, (Jore and DeParasis, 1993). Este dominio comparte 65.5% y 61.5% de identidad con las α -amilasas de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus bovis*, respectivamente (Morlon-Guyot *et al.*, 2001).
2. La mitad 3' del gen está formada por unidades repetidas, directas e idénticas de 273 nucleótidos cada una, el número depende de la especie, 4 para *L. plantarum*, *L. manihotivorus* y 5 para *L. amylovorus* (Giraud and Cuny, 1997; Morlon-Guyot *et al.*, 2001). El papel de estas unidades se identificó utilizando dos donas, una con la amilasa entera de *L. amylovorus* y la otra con la amilasa sin unidades repetidas. La comparación de las propiedades bioquímicas de las dos amilasas reveló que la mitad carboxilo terminal de la enzima es la responsable de la fijación al almidón insoluble permitiendo su hidrólisis (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000).

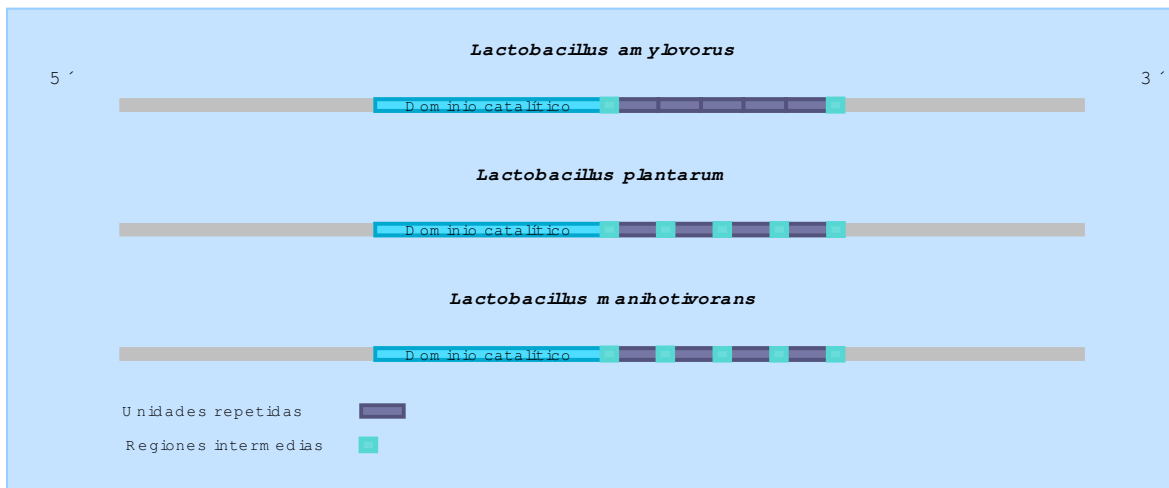


Fig. 2 Estructura del gen de la α -amilasa de lactobacilos

La presencia de unidades repetidas es una característica común en el dominio de fijación al ligando de diferentes proteínas especialmente glucosil-hidrolasas. Se encuentran en los dominios de fijación a carbohidratos de las dextran-sacarosas de *Leuconostoc* spp, en las gluco-sacarosas y las glucosiltransferasas de *Streptococcus* spp y *Leuconostoc* spp, (10UR, con promedio de 20 aa) (Shch and Russell, 2002); también en el DFC de la endoglucanasa de *Cellulomonas fimi* (2UR) (Creagh *et al.*, 1998), en la quitinasa extracelular Chi92 de *Aeromonas hydrophila* JP101 (3UR) (Wu *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 1999) y en la xilanasa de *Clostridium thermocellum* (2UR) (Fernandes *et al.*, 1999). Existen además UR en proteínas sin actividad glucosidrolítica, como en las toxinas A y B de *Clostridium difficile* cuya función es la de unirse a los azúcares de la superficie de la célula blanca (Wren, 1991).

En enzimas amilolíticas es poco usual, el único caso reportado, además del descrito en lactobacilos es el de una α -amilasa de *Bacillus* sp no.195 que presenta en la región carboxilo terminal dos unidades repetidas casi idénticas, de aproximadamente 90 aminoácidos que contribuyen a la degradación de almidón insoluble (Suminani *et al.*, 2000). En todos los casos aquí descritos, los MFC conservan ciertos residuos, particularmente los aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina.

Al comparar una de las unidades de las cinco que forman el dominio carboxilo terminal de la α -amilasa de *L. amylovorus* contra el DFA de otras amilasas, se encontró que se

conserva alrededor del 30% de los aminoácidos algunos de los cuales se han identificado como importantes en la unión al sustrato, entre éstos se encuentran dos residuos de triptófano y una asparagina del sitio I y un triptófano del sitio II (Rodríguez-Sanoja, 2001). Estos datos sugirieron que cada unidad repetida puede ser un dominio independiente, por lo que se establecieron los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si las 5 unidades repetidas, aisladas del sitio catártico, son funcionales y si es así, determinar si constituyen un dominio o módulos separados cuya función en la fijación pueda ser sumatoria.

Objetivos particulares:

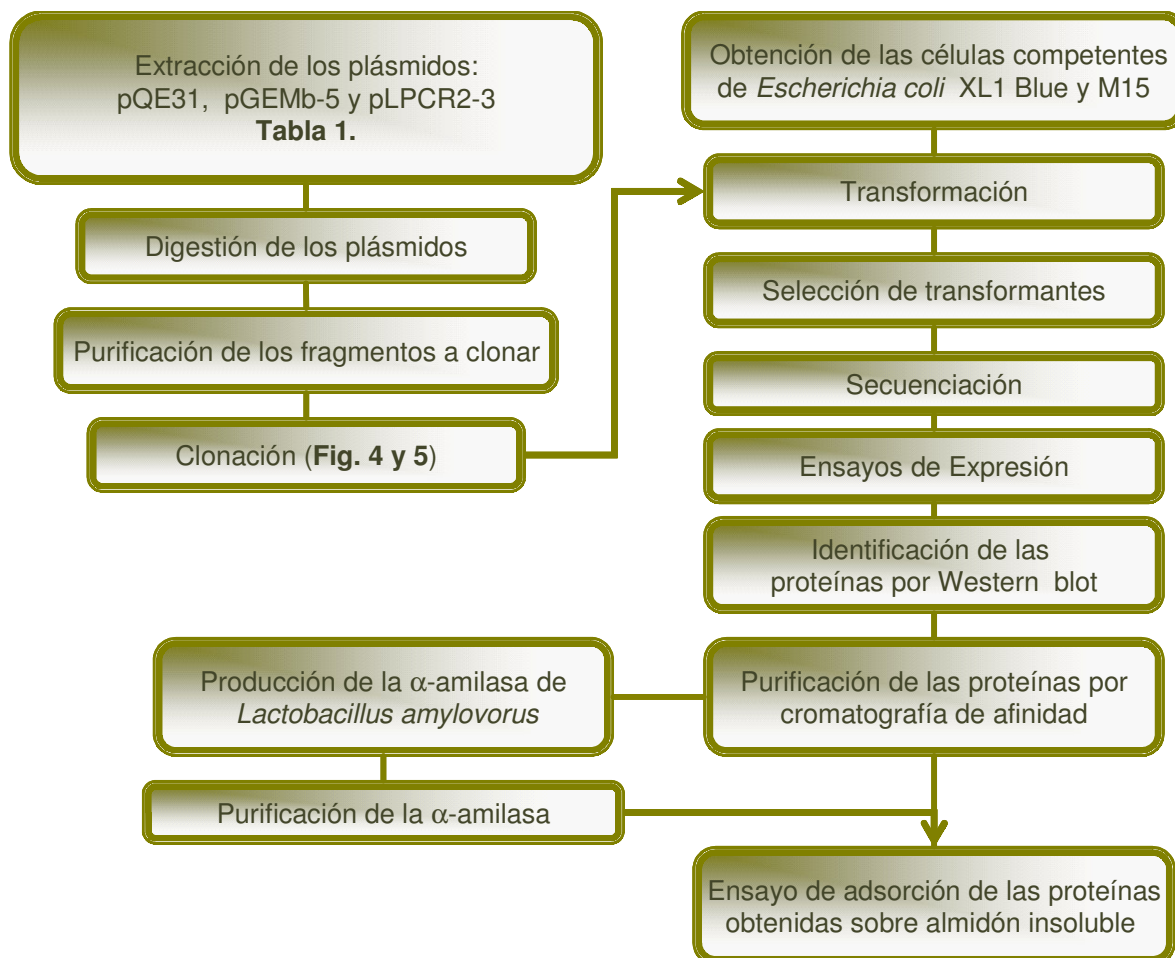
- Clonar una secuencia repetida del gen α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.
- Clonar las cinco unidades repetidas del gen α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.
- Determinar la capacidad de fijación al almidón de los péptidos donados (con 1 y 5 unidades repetidas) y compararla con la capacidad de fijación de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

HIPÓTESIS

Considerando que el tamaño de cada UR corresponde al de un DFA y dado que dentro de cada una de las unidades repetidas se encuentran conservados aminoácidos que se han identificado como importantes para la fijación al sustrato, es posible que cada unidad sea capaz de fijarse al almidón insoluble.

MATERIALES Y METODOS

1. Estrategia experimental



2. Cepas y plásmidos utilizados.

Bacteria o Plásmido	Características
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>SupE44hsdR17recA1 endA1 gyrA46thi relA1lacF'(proAB⁺ lacZΔM15Tn10(tet^r))</i> Cepa no recombinante.
<i>Escherichia coli</i> M15	<i>Kan^R</i> Cepa que contiene el plásmido pREP-4, el cual contiene el gen de la proteína represora <i>lacY</i> como marcador el gen de resistencia a kanamicina
<i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4540	Originalmente aislada por Nakamura en 1981, de desperdicios de maíz fermentado.
pGEMb5	Derivado del vector pGEM-T-Easy (Promega), en el que se donó una secuencia repetida del gen <i>amyA</i> amplificada por PCR. La secuencia donada tiene un tamaño de 273 pb. (Rodríguez-Sanoja, 2001) (Ver apéndice I.A).

<i>pLPCR2-3</i>	Plásmido derivado del vector <i>pLPCR2</i> de <i>Lactobacillus</i> contiene el gen de la amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i> . (Jore and Deparasis, 1993) (Ver apéndice I.B).
<i>pQE31</i>	Vector de expresión de 3.5 kb, contiene el promotor del operón <i>lac</i> con dos operadores <i>lac</i> ; y como marcador el gen de resistencia a ampicilina (Quiagen). Contiene un tdlo de histidinas (6xHis) lo que permite identificar y purificar la proteína recombinante. (Fig. 3)

Tabla 1. Características generales de las cepas y plásmidos utilizados.

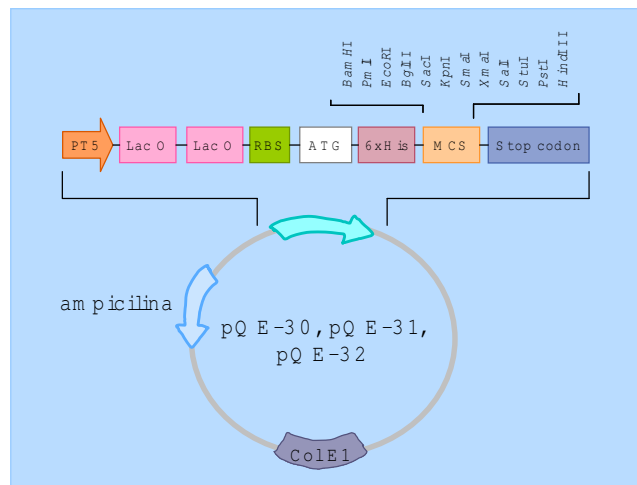


Fig. 3: Vector de expresión pQE30, 31 y 32. Contiene **PT5**: promotor T5, **lac O**: operador *lac*, **RBS**: sitio de unión a ribosoma, **ATG**: codón de inicio, **6xHis**: cola o tallo de 6 histidinas, **MCS**: sitio de donación múltiple, **Stop codon**: codón de término en los tres marcos de lectura, **Col E1**: origen de replicación, **Ampicilina** gen de resistencia a ampicilina

3. Conservación de los microorganismos: Las cepas utilizadas de *Escherichia coli* se conservaron a -70°C en glicerol al 40%.

4. Extracción de plásmido: Las células se crecieron en medio LB (apéndice II, A) con ampicilina 100 µg/ml toda la noche, en el caso de la cepa *M15* también se adicionó kanamicina a una concentración de 25 µg/ml, posteriormente los plásmidos referidos en la **tabla I** fueron extraídos de *Escherichia coli XL1-blue* por el método de lisis dclina descrito por Sambrook *et al.*, 1998. (Ver apéndice III, A)

5. Verificación del ADN obtenido: Se realizaron electroforesis de los plásmidos obtenidos en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. El ADN fue visualizado con luz UV ya que el bromuro de etidio se intercala

entre las bases del ADN y emite fluorescencia cuando se irradia con la luz UV. Cuando fue necesario estimar la talla de los fragmentos, los plásmidos fueron sometidos a digestión con diferentes enzimas de restricción (de acuerdo a las indicaciones del proveedor) y entonces se relacionó la distancia que migró el fragmento de interés con respecto al \log_{10} de la talla del marcador molecular (Sambrook *et al.*, 1998). (Ver *apéndice, III.D*)

6. Clonación de 1 UR y 5 UR (Dominio de fijación): Se digirió el plásmido *pGEM-b5* (1 UR), con *EcoRI*, posteriormente se trató con la nucleasa *Mung bean* y se realizó una segunda digestión con *BamHI*. Mientras que el vector de expresión *pQE31* fue digerido con *SmaI* y *BamHI*, generando sitios compatibles con los del fragmento. **Fig. 4**

Para realizar la donación de las 5 UR se digirió el plásmido *pLPCR2-3* con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, que cortan liberando los cinco unidades repetidas. Estas mismas enzimas se usaron para digerir el vector de expresión *pQE31*. La estrategia de donación se muestra en la **Fig. 5**

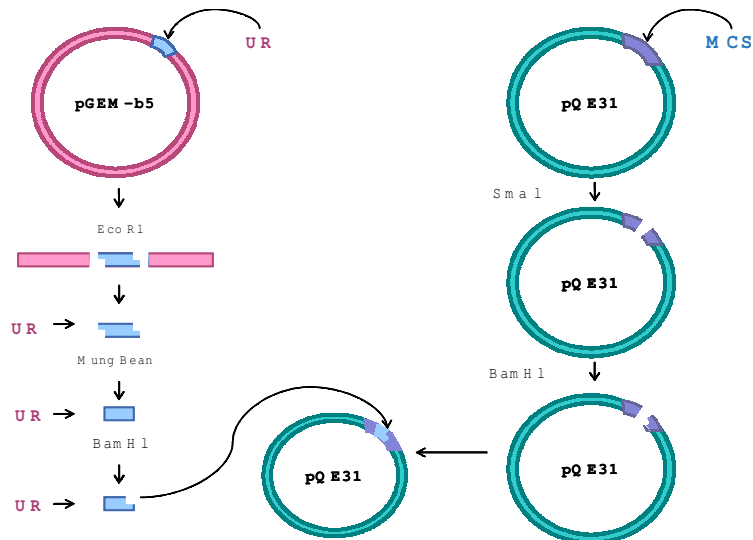


Fig. 4: Clonación de 1 UR

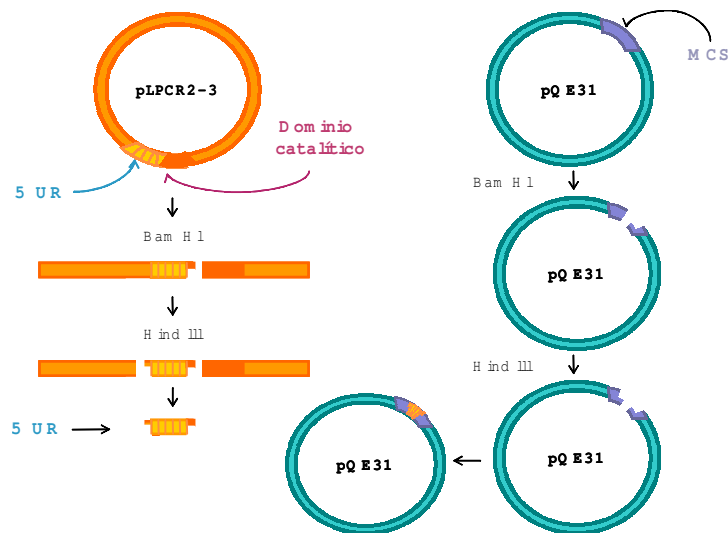


Fig. 5: Clonación de 5 UR

7. Purificación de ADN: Después de hacer migrar en una electroforesis las muestras digeridas de ADN, las bandas de interés se cortaron del gel de agarosa y se purificaron haciéndolas pasar por columnas de fibra de vidrio. La pureza se verificó por la relación de absorción 260/280 nm, entendiéndose que si esta relación daba 1.8-2.0 la muestra estaba limpia y podíamos continuar con la donación.

La ligación de los fragmentos de 1 y 5 UR al vector de expresión se realizó con ligasa T4 a 4°C.

8. Obtención de células electrocompetentes: Se crecieron dos cepas de *Escherichia coli*: *XL1-blue* y *M15* en tubos con 5 ml de medio LB con agitación continua a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se inoculó en medio LB fresco al 1% y se incubó en las mismas condiciones por 3 h. Las células se cosecharon a una densidad óptica (DO_{600}) de 0.646, posteriormente se continuó con el método de producción de alta eficiencia de electrotransformantes de *E. coli* citado por Ausubel *et al.*, 1994. (Ver apéndice, III.E)

9. Transformación: Los plásmidos fueron introducidos a *E. coli XL1-blue* y *M15* por electroporación con un voltaje de 1250V. Los transformantes de *XL1-Blue* se seleccionaron en medio LB sólido con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y glucosa al 2% y para *M15* además se adicionó kanamicina a 25 µg/ml.

10. Análisis de los transformantes: Se seleccionaron 12 transformantes para su análisis. Se extrajo el plásmido y se verificó la presencia del fragmento por digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Pst*I.

En el caso de los transformantes con los 5 UR se seleccionaron 3 UFC (unidades formadoras de colonia) de XL1-blue y 2 UFC de M15, se crecieron en medio LB con ampicilina, kanamicina y glucosa al 2%; se extrajeron los plásmidos y se digirieron con *Bam*HI/*Hind*III para verificar la presencia del inserto.

De los transformantes que mostraron contener el inserto de talla adecuada se seleccionaron 2 con 1 UR y 2 con 5 UR. Se purificaron los plásmidos con el "Plasmid mini kit" (Qiagen) y se enviaron a secuenciar a Larogen Inc. USA.

11. Ensayos de Expresión del péptido donado: Para determinar la condición óptima de expresión de los péptidos donados se utilizaron dos concentraciones de IPTG, (isopropilthio β -D-galactósido) 0.4 mM y 1.0 mM, el cual se añadió a 5 ml de cultivo de *E. coli* al final de la fase exponencial (10 horas), posteriormente se tomaron muestras a las 2, 4 y 8 horas. Las proteínas obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% para los 5 UR y al 12% para 1 UR. (Ver apéndice, IV.A)

10. Identificación de las proteínas recombinantes: Las proteínas fueron transferidas a membranas de polyvinylide fluoride (Millipore inmobilon-P Transfer) \emptyset de 0.045 μ m en un transblot Bio-Rad a 60 V durante 1.5 horas, la identificación se realizó con un anticuerpo anti-His que fue posteriormente identificado en una reacción colorida con un anticuerpo secundario anti-mouse igG acoplado a una fosfatasa alcalina

El revelado de la membrana se realizó agregando el sustrato de la fosfatasa alcalina que es BCIP/NBT (5-bromo-4-doro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21 g/L y nitroazul de tetrasolio a una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/ Tris buffer). (Ver apéndice, IV.B)

11. Producción de los péptidos: Se inocularon 250 ml de medio LB-ampicilina con *E. coli* XL1-blue (pQE31-1UR), al final de la fase exponencial se añadió IPTG 0.4 mM y se dejó incubar 8 horas más, se colectaron las células por centrifugación y se congelaron.

Para producir la proteína con 5 UR se creó *E. coli* M15 (pQE31-5UR) en 1.2 litros de medio LB con ampicilina y kanamicina, al final de la fase exponencial se añadió IPTG a una concentración de 0.4 mM, incubando durante 8 h. Las células fueron colectadas y conservadas en congelación.

12. Purificación de las proteínas recombinantes: Las células inducidas que antes fueron congeladas, se resuspendieron en un tampón de fosfatos pH 7.4 con imidazol 0.05M e inhibidor de proteasas (Sigma, cóctel para uso general) y a continuación se lisaron por sonicación, se centrifugó para recuperar el sobrenadante en el cual se tienen las proteínas ya solubilizadas y se filtró la muestra en una membrana de \varnothing de 0.45 μ m. Todo este procedimiento se realizó a 4 ° C.

Las proteínas obtenidas se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de sefarosaniquelada (Ver apéndice, IV.C)

Las proteínas puras fueron dializadas en membranas de celulosa (Sigma, Tubo de diálisis de 33 mm x 21 mm) de contra tampón de citratos-fosfatos 0.01M a pH 5 a 4° C durante 12 h.

13. Producción de α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Se creó *L. amylovorus* en 1 litro de medio MRS con almidón soluble al 2% (ver apéndice II.C), incubándolo a 29° C toda la noche.

14. Purificación de la α -amilasa: La amilasa fue purificada del caldo de fermentación por cromatografía de afinidad, usando como ligando β -ciclodextrina acoplada a sefarosa 6B epoxy-activada (Pharmacia). (Ver apéndice, IV, D)

15. Ensayos de adsorción al sustrato: se adicionaron concentraciones crecientes de la proteína purificada a una suspensión de almidón de maíz insoluble en tampón citrato-fosfatos 0.1M pH 5. La adsorción se estimó por la diferencia de la proteína añadida (blanco sin almidón) y la proteína que queda libre en el sobrenadante después de incubar la mezcla 30 min a 4°C. (Ver *apéndice, IV, E*)

La concentración de las proteínas se obtuvo mediante la aplicación de la ley de Lambert y Beer, utilizando la fórmula $\lambda: \epsilon CL$

λ : Absorbancia

ϵ : coeficiente de extinción molar

C: concentración

L: distancia que viaja la luz a través de la muestra (1 cm.)

Coficiente de extinción molar de las proteínas:

ϵ 1 UR: 20416 L/mol · cm.

ϵ 5 UR: 102080 L/mol · cm.

ϵ α -amilasa 207680 L/mol · cm.

RESULTADOS

Para la expresión del dominio de fijación al almidón (5 UR) y una de las unidades repetidas se seleccionaron los vectores de expresión pQE30, 31 y 32 (Qiagen). Todos estos permiten fusionar el péptido de interés a una cola de histidinas, para el posterior reconocimiento y purificación. Además optimizan los elementos promotor y operador ya que contienen el promotor T5 y dos secuencias operadoras *lac* que aumentan la unión del represor *lac* y aseguran eficientemente la represión, mientras que los tres vectores de expresión dan los tres marcos de lectura. Así conociendo las secuencias de 1 UR y del gen de α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* se realizaron las donaciones teóricas con los 3 vectores con vectores de expresión (pQE30, 31 y 32); encontrándose que el pQE31 era el que nos permitía la expresión de ambas proteínas.

Obtención del ADN

Seleccionado el vector de expresión adecuado, se realizó la extracción (mini-prep) de los plásmidos pQE31, pGEM-b5 y pLPCR2-3.

El gen de α -amilasa presenta un sitio de restricción *Bam*HI entre el dominio catalítico y el dominio de fijación al almidón, el cual fue aprovechando para la donación de ambos péptidos. El segundo sitio se eligió entre los presentes en el vector donde se encontraba el ADN donado, *Eco*RI-*Mung bean* para formar el sitio compatible con *Sma*I, en el caso del pGEM-b5 y *Hind*III en el caso del pLPCR2-3.

Digeridos los plásmidos, el ADN se separó en electroforesis horizontal sobre agarosa, los fragmentos de interés (1 UR y DFA) se seleccionaron por talla, se cortaron del gel y se purificaron en columna de fibra de vidrio. Los fragmentos obtenidos se muestran en los **Fig. 6 y 7.**

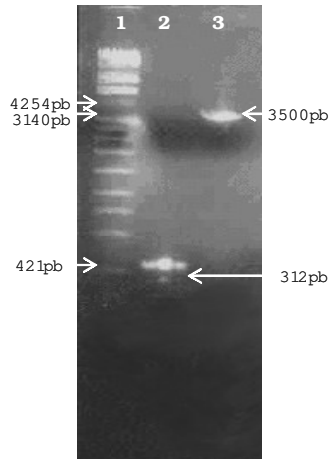


Fig. 6 Fragmentos purificados. Carril 1: marcador de peso molecular IV (Roche); carril 2: fragmento que corresponde a 1 UR, obtenida del pGEM-b5; carril 3: el vector de expresión digerido con *Bam* HI y *Sma*I.

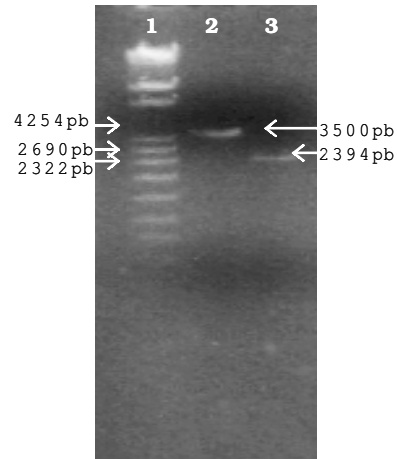


Fig. 7 Fragmentos purificados. Carril 1: marcador de peso molecular IV; carril 2: vector de expresión digerido con *Bam* HI y *Hind* III; carril 3: (5 UR) obtenido de la digestión del plásmido pLPCR2-3.

Clonación, expresión y purificación de 1 UR

Los fragmentos purificados fueron ligados e introducidos a *E. coli* XL1-blue por electroporación. Se seleccionaron 12 donas cuyo ADN plasmídico fue digerido con *Bam* HI y *Pst* I para verificar la presencia del inserto (**Fig.8 y 9**), 4 presentaron el inserto y solo se seleccionaron 2 para su secuenciación. De las dos donas secuenciadas sólo una de ellas presentó el inserto de 1 UR correcto (**Fig.10**) ya que la segunda recombinó quedando con una secuencia y media, por lo tanto se continuó trabajando con la primera dona que se nombró pQE31-1UR.

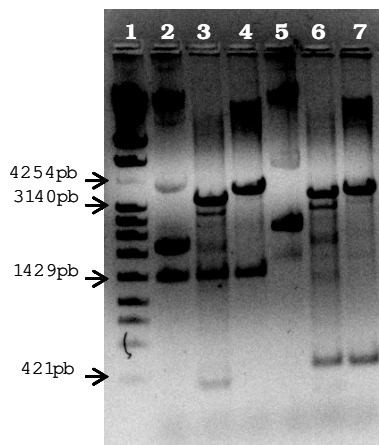


Fig. 8 Digestión del ADN plasmídico de dos de las donas transformantes obtenidas. Carril 1: marcador de peso molecular IV (Roche); carril 2: ADN de la primera dona; carril 3: dona 1 digerida con *Bam* HI y *Pst* I, carril 4: dona 1 digerida con *Bam* HI, carril 5: ADN de la dona 2, carril 6: dona 2 digerida con *Bam* HI y *Pst* I; carril 7: dona 2 digerida con *Bam* HI.

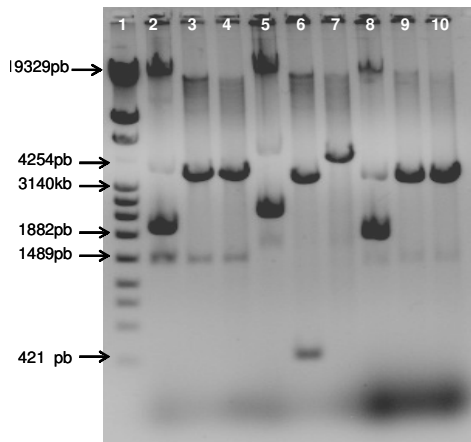


Fig. 9 Digestión de ADN plasmídico de las dos donas transformante. Carril 1: marcador de peso molecular IV (Roche); carril 2: ADN de la primera dona; carril 3: dona 1 digerida con *Bam* HI; carril 4: dona 1 digerida con *Pst* I; carril 5: ADN de la segunda dona; carril 6: dona 2 digerida con *Bam* HI; carril 7: dona 2 digerida con *Pst* I; carril 8: ADN plasmídico del vector de expresión pQE31; carril 9: pQE31 digerido con *Bam* HI; carril 10: pQE31 digerido con *Pst* I.

GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNGNNNNNNNGCGNGGCCAATCATTAAAGAGGAGAAATTAACATATGA
 GAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCAACAAGCAGCAGCAGTACAACAACAGAAACTAAAAAAGGT
 TTATTTTGA AAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAAAGCT
 ATAACCTCAGCTTGGCCTGGCAAAAAAATGACCGCTTTAGGTAACGACGAATATGAATTGGATCTCGACACTG
 ATGAAGATGACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAAGCAAACACCAGCAGCTAATGAGGCTGG
 TTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGTAAGAACTTCTGATTCAAGCAGCACATCA
AGCAATTCGTAAGCCGATAACCAGCAGTTCATCAATCGGGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTTAGCTTGAG
 CTTGGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATTGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGGTTTCAGAACGCTCCGGT
 TGGCCGCCCGCGTTTTTTTTATTTGGTGGAGAATTCCAAGCTNAGCCTTGGGCGAGAATTTCCANGGACTTAA
 GGAAGCTAAAATGGGAGAAAAAAAATCCCTGGGATTTTACCANCCGGTGGATTTTATNCCCAATNNGGCATCGT
 AAAAAAACATTTTTNGANGNCATTTCCAATCCGNTTGCTCCAATGGTTNCCTATTAACCAGAACCCGGTTCAA
 GCTTGGATTNTTACCNGGCC

Fig.10 Secuencia de la dona de pQE31-1UR. El área sombreada corresponde a la secuencia de una unidad repetida, el área subrayada a los 6xHis, en negritas son las regiones de serinas y treoninas, lo que está doblemente subrayado es el sitio de restricción *Bam* HI y el área punteada corresponde al sitio de restricción *Sma*I.

Mientras se secuenciaban las donas se realizaron los ensayos de inducción para la expresión de 1 UR. Se probaron dos concentraciones de IPTG (0.4-1.0 mM) y se tomaron muestras a diferentes tiempos 0, 2, 4, 8 horas. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) observándose que se engrosaba una banda que migraba a una talla equivalente a 1 UR, es decir, como el péptido que se esperaba (**Fig.11**).

Establecidas las condiciones de expresión se realizó un cultivo mayor (250 ml) donde la expresión de la proteína fue inducida con IPTG a 0.4 mM por 8 h.

La **figura 12** muestra la proteína total obtenida y la **figura 13** el western blot realizado sobre este mismo cultivo para verificar que el péptido que se inducía era realmente el donado. El reconocimiento se realizó con un anticuerpo anti-Histidina el cual es reconocido por un segundo anticuerpo que está acoplado a una fosfatasa alcalina,

permitiéndonos observar como reacción positiva una banda colorida. En los carriles 1 y 2 se observa reconocimiento de los anticuerpos sobre el control positivo (marcador de peso molecular con tallo de histidinas) y la muestra, corroborando que teníamos la proteína de interés.

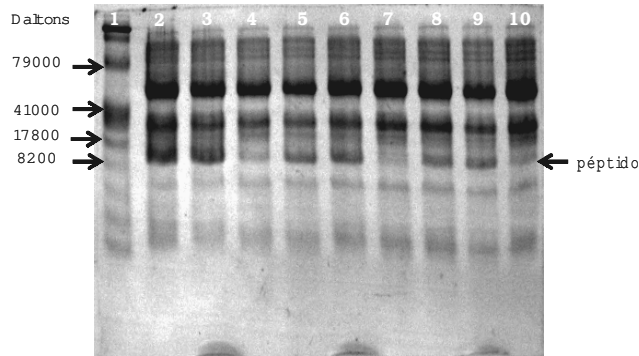


Fig. 11 Ensayo de expresión de la proteína con 1 UR. Carril 1: marcador de peso molecular Kdeidoscope (Bio-Rad); carril 2: lisado de células de *E. coli* XL-blue inducidas con 1mM de IPTG durante 8 h; carril 3: lisado de células inducidas con 0.4 mM del inductor por 8 h; carril 4: células sin inducir a 8 h; carril 5 y 6: células inducidas con 1 y 0.4 mM de IPTG a 4h; carril 7: células sin inducir a 4h; carril 8 y 9: células inducidas a 1 y 0.4 mM por 2 h; carril 10: células sin inducir por 2 h.

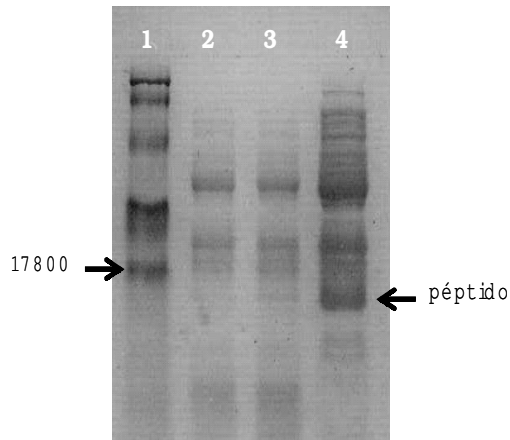


Fig. 12 Proteína total. Carril 1: marcador molecular Kdeidoscope (Bio-Rad); carril 2: *E. coli* pQE31-1UR sin inducir, 0 h; carril 3: *E. coli* pQE31-1UR sin inducir, 8 h; carril 4: *E. coli* pQE31-1UR inducido, 8 h.

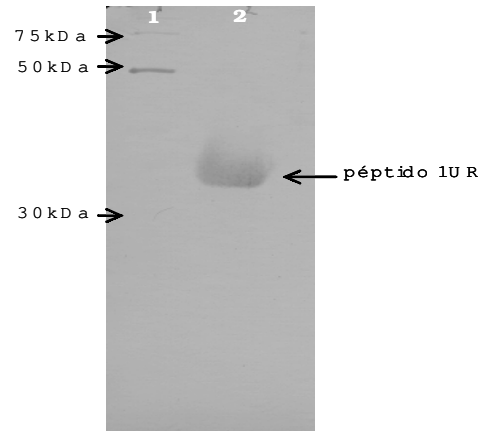


Fig. 13 Identificación de la proteína 1 UR por Western blot. Carril 1: marcador de peso molecular 6x-His Ladder (Qiagen); carril 2: *E. coli* pQE31-1UR inducido.

Con la proteína (1 UR) producida, se prosiguió a redizar los ensayos de purificación. Para lo cual las células inducidas se resuspendieron en tampón de fosfatos a pH 7.4 con inhibidor de proteasas, posteriormente se lisaron por sonicación. La muestra se hizo pasar por la columna usando como ligando sefarosaniquelada donde las histidinas interaccionan con el níquel. Una vez adsorbidas a la columna todas las proteínas se

realizaron varios lavados para eliminar las proteínas de *E. coli* que pudieron adsorberse y se eluyó la proteína donada.

En la **Figura 14-A** se observan los lavados realizados a la columna, se puede notar que se pierde proteína que corresponde en talla a la proteína donada, sin que se observe presencia de productos de degradación u otras proteínas. Al eluir, se observa claramente una banda (**Fig. 14-B**) y que corresponde en talla a la proteína esperada.

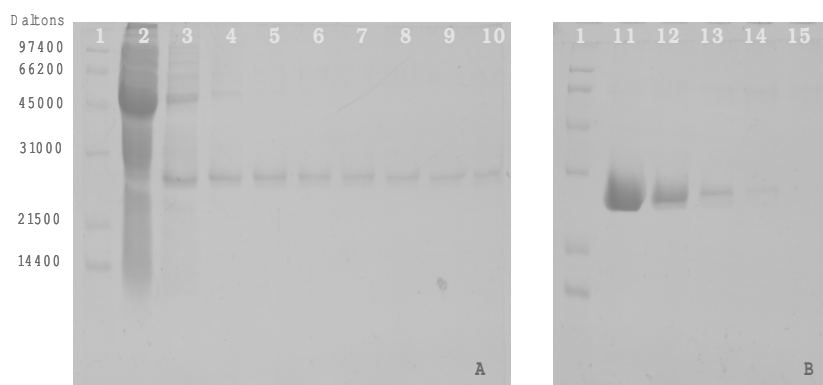


Fig. 14 Primer ensayo de purificación de la proteína 1 UR. Carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: proteínas no adsorbidas a la columna; carril 3-10: los diferentes lavados; carriles 11-15: las cinco eluciones realizadas a la columna.

Clonación, expresión y purificación de Dominio de fijación (5 UR)

El ADN que codificaba 5 UR y el vector de expresión fueron purificados, ligados y transformados en dos cepas de *E. coli*, XL1-blue y M15. Se obtuvieron 9 donas de XL1-Blue y 50 donas de M15, entre ellas se seleccionaron al azar 5 que fueron digeridas con *Bam* HI y *Pst* I para confirmar la presencia del inserto. En los tres de las donas seleccionadas de XL1-Blue y las dos donas de M15, el inserto era de tamaño equivalente a las 5 UR (**Fig. 15**). Posteriormente se seleccionó una dona de cada cepa y se secuenciaron 700 nucleótidos de cada extremo, ambas cepas contenían el mismo inserto en el marco de lectura correcto (**Fig. 16**).

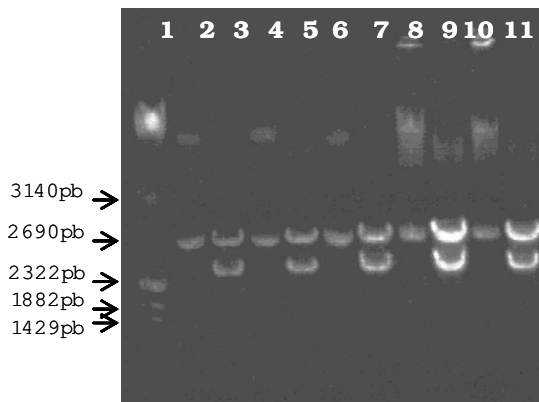


Fig. 15 Digestión del ADN plasmídico de las donas transformantes obtenidas. Carril 1: marcador de peso molecular IV (Roche); carril 2: XL1-Blue-I; carril 3: XL1-Blue-I digerida con *Bam* HI y *Hind* III; carril 4: XL1-Blue-II; carril 5: XL1-Blue-II digerida con *Bam* HI y *Hind* III; carril 6: XL1-Blue-III; carril 7: XL1-Blue-III digerida con *Bam* HI y *Hind* III; carril 8: M15-I; carril 9: M15-I digerida con *Bam* HI y *Hind* III; carril 10: ADN M15-II; carril 11: M15-II digerida con *Bam* HI y *Hind* III.

```

GGNNNNNNNGGGGNGCTGNNTTAAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCAAACA
AGCAGCAGCAGTACAACAACAGAACTAAAAAGGTTTATTTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTAT
GTTTATAATAAAAAATACGAATAAAGCTATAAAGCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAA
GAATTGGATCTCGACACTGATGAAGATGACTCTGATTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGCT
AATGAGGCTGGTTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGCGTAAGAAGTTCTGATTCAAGCAGCACA
TCAAAAAAGGTTTATTTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAA
GCTATAAAGCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAA
GATGACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGCTTAATTGAGGCTGGGTTTTACCTT
TAACGGGCTGGATTGCCACTTTATTGATCCAAAANNGGGTGGTNCGGTAAAAAAAAGGGTTTATTTTGAAAAAAGC
CCNTTCCAAAGTTTGGGGGGTTAGTTAAGAAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAA

```

Fig. 16 Secuencia 5' de las 5 UR donadas en M15 y XL1-Blue. El área punteada indica las 6xHis, subrayado se muestra el sitio *Bam* HI, en negritas serinas y treoninas y el área sombreada el inicio de las 5 unidades repetidas.

Se redizaron los ensayos de expresión con la dona de M15, la cual se nombró pQE31-5UR. Se probó la concentración de IPTG definida para pQE31-1UR (0.4 mM) con dos tiempos de inducción 4 y 8 h y se añadió una tercera variable, las células fueron crecidas en presencia de glucosa 1%, 2% o sin glucosa. La glucosa fue utilizada para asegurar la represión en la expresión de las 5 UR antes de la inducción, ya que, al tratarse de unidades repetidas se temía que pudieran ser inestables.

La figura 17 muestra el ensayo de expresión de la proteína con 5 UR. Al analizar el gel de poliacrilamida SDS-PAGE, no se encontraron diferencias entre las muestras inducidas y sin inducir en las diferentes condiciones de expresión utilizadas (**Fig. 17**), por lo que se optó por identificar la proteína directamente en un western blot (**Fig. 18**), como se puede observar la expresión se ve afectada por la presencia de glucosa en el medio, a mayor concentración de glucosa la expresión de la proteína disminuye, por otro lado no parece existir inestabilidad en la construcción.

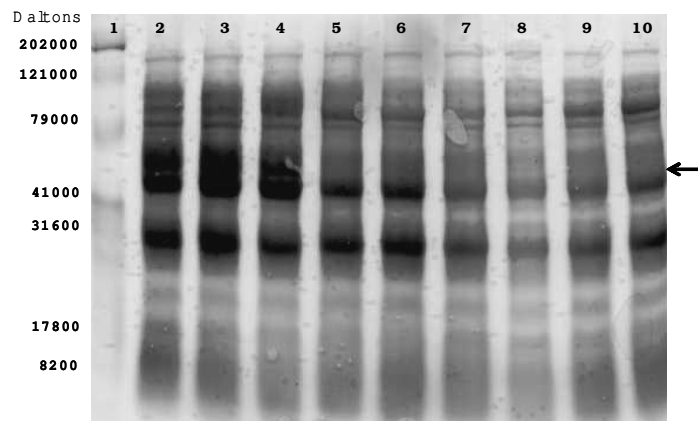


Fig. 17. Proteína total de las células de *E. coli* M15 pQE31-5UR, crecidas en diferentes condiciones. Carril 1: marcador de peso molecular Kaleidoscope (Bio-Rad); carril 2: lisado de células sin inducir 0 h sin glucosa; carril 3: lisado de células sin inducir a 8 h sin glucosa; carril 4: lisado de células inducidas con 0,4 mM de IPTG por 8 h sin glucosa; carril 5: lisado de células sin inducir 0 h con glucosa 1%; carril 6: lisado de células sin inducir a 8 h con glucosa d 1%; carril 7: lisado de células inducidas a 8 h con glucosa 1%; carril 8: lisado de células sin inducir 0 h con glucosa 2%; carril 9: lisado de células sin inducir a 8 h con glucosa 2%; carril 10: lisado de células inducidas 8 h con glucosa 2%.

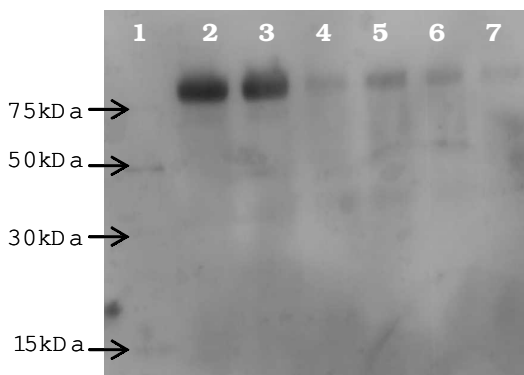


Fig. 18 Western Blot para verificar la expresión de la proteína que contiene 5 UR. Carril 1: marcador de peso molecular 6x-His Ladder (Quiagen); carriles 2 y 3: células inducidas 4 y 8 h con IPTG sin glucosa; carriles 4 y 5: células inducidas a 4 y 8 h con glucosa d 1%; carriles 6 y 7: células inducidas a las 4 y 8 h con glucosa d 2%.

Por la intensidad de la banda del western blot, se seleccionó expresar la proteína en un cultivo de 1200 ml con IPTG 0.4mM y sin glucosa durante 8 h (**Fig. 18**). Las células inducidas fueron colectadas por centrifugación y conservadas en congelación.

Para el primer ensayo de purificación, una vez más se tomaron como referencia las condiciones de purificación establecidas para la proteína con 1 UR donada. En la **Fig. 19-A** se pueden observar los lavados realizados a la columna de afinidad, siendo en los dos primeros lavados en donde se eliminan proteínas, pero ninguna que corresponda al tamaño de la proteína de 5 UR. Al eluir la columna no se encontró la proteína de interés pura (**Fig. 19-B**), se danzan a observar otras proteínas o tal vez productos de degradación de la proteína de interés.

Se pensó que la proteína pudiera estar en cuerpos de inclusión, que el tiempo de rompimiento celular fuese insuficiente o en la degradación de la proteína durante el proceso de purificación. Para descartar posibilidades se decidió hacer un western blot; en él se analizaron muestras de células inducidas para la producción total proteína (1200 ml), células lisadas por sonicación, la primera elución obtenida del primer ensayo y células incluidas en el ensayo de expresión como control positivo.

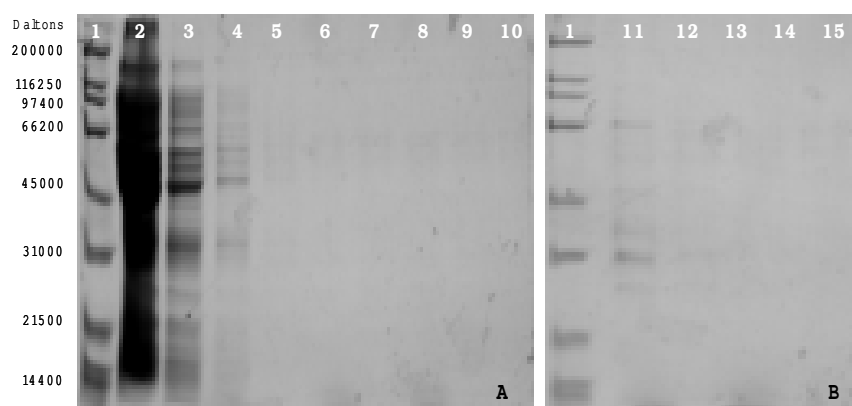


Fig. 19 Lavados y eluciones obtenidas en el primer ensayo de purificación de las 5 UR. Carril 1: marcador peso molecular Broad Range (Bio-Rad); carril 2: proteínas no adsorbidas; carriles 3-10: del primer lavado; carriles 11-15: las 5 eluciones realizadas a la columna

El análisis por western blot permitió comprobar que las células que se sometieron a la purificación no habían liberado la proteína, sea porque las células no se rompieron adecuadamente o bien, porque la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión (**Fig. 20**), por lo que como primer paso se alargó el tiempo de sonicación, como se muestra en la **Fig. 21** esto permitió recuperar la proteína en forma soluble.

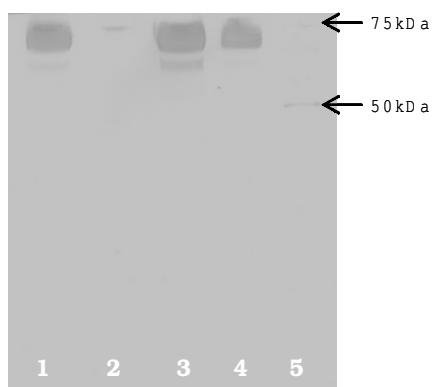


Fig. 20. Western blot. Carril 1: lisado de células con inducción de 8 h y sin glucosa; carril 2: elución obtenida de la columna durante el primer ensayo de purificación; carril 3: restos celulares al final del primer ensayo de purificación; carril 4: lisado de células producidas para la purificación de la proteína de 5 UR; carril 5: marcador de peso molecular 6x-His Ladder (Quiagen).

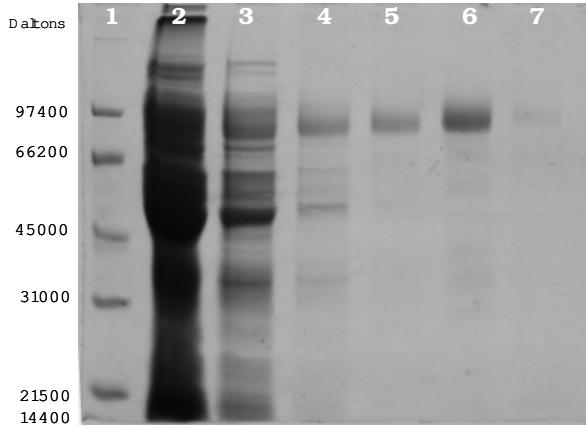


Fig. 21. Segundo ensayo de purificación de proteína (5 UR). Carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: proteínas no adsorbidas; carriles 3-5: lavados; carriles 6 y 7: primera y segunda elución.

Para eliminar esas proteínas que se eluyen junto con la proteína de 5 UR, se aumentó la concentración de imidazol del tampón que se utiliza para lavar la columna, de 0.025 a 0.05M (**Fig. 22**).

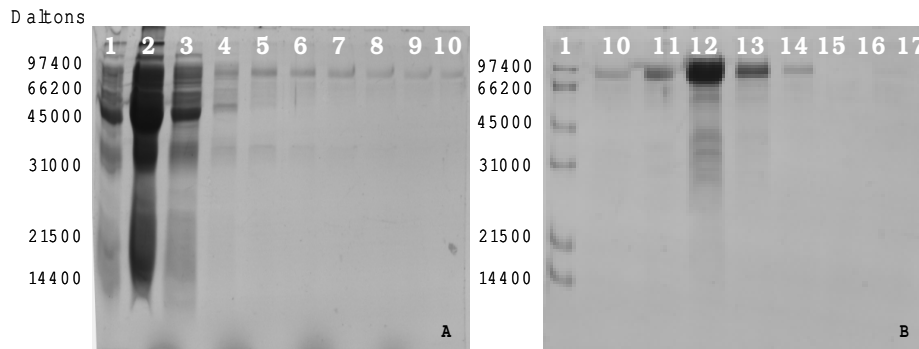


Fig. 22. Tercer ensayo de purificación de la proteína (5 UR). En el carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: proteínas no adsorbidas; carriles 3-12: los diez lavados; carriles 13-17: las cinco eluciones.

Se cambió la concentración de imidazol del tampón de lavado a 0.01M y el tampón de elución de 0.5M a 0.25M. La **Fig. 23-A** muestra que en los lavados ya no hay pérdida de proteína, sin embargo, sigue habiendo otras proteínas en las eluciones (**Fig. 23-B**).

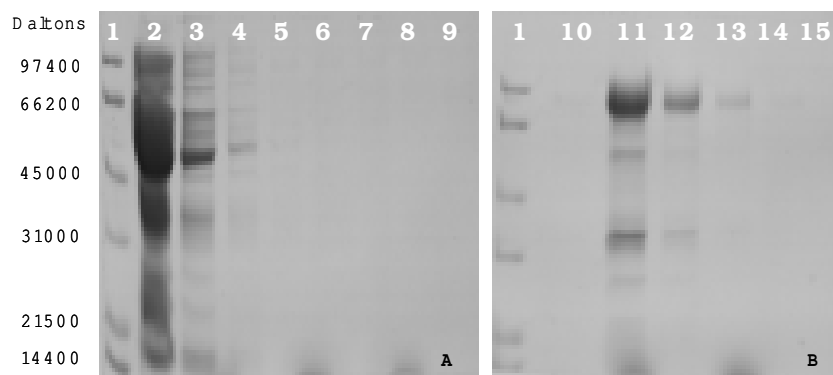


Fig. 23. Cuarto ensayo de purificación. Carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: las proteínas no adsorbidas; carriles 3-10: lavados; carriles 11-15: eluciones.

Al no obtener en ningún ensayo de purificación las condiciones óptimas para la purificación de la proteína, se decidió realizar una purificación parcial bajo las condiciones utilizadas en el segundo ensayo, en el cual se obtenía la proteína del tamaño esperado con menor contaminación por otras proteínas (**Fig. 24**) y posteriormente realizar un segundo paso por la columna eluyendo con un gradiente de imidazol (**Fig. 25**), lo que finalmente permitió recuperar la proteína pura.

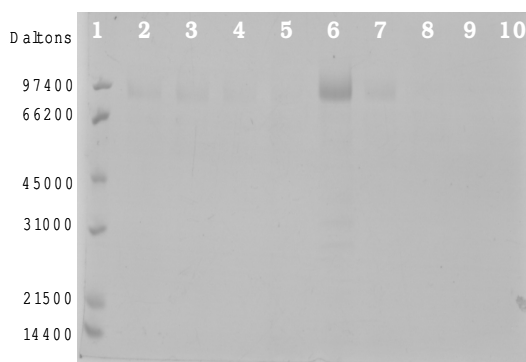


Fig. 24 Purificación de las 5 UR. Carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: tercer lavado; carril 3: cuarto lavado; carril 4: lavados 5-8; carril 5: lavados 9 y 10; carril 6: primera elución; carril 7: segunda elución; carril 8: tercera elución; carril 9: cuarta elución; carril 10: quinta elución.

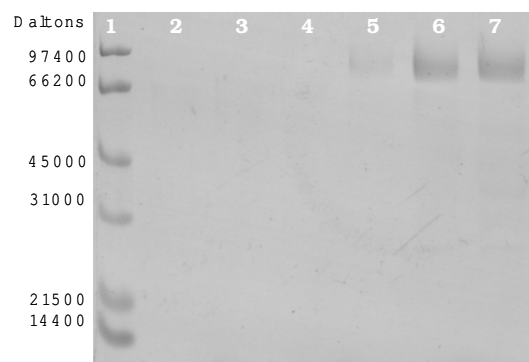


Fig. 25 Eluciones obtenidas al pasar por segunda vez por la columna de afinidad (descrito en el texto). Carril 1: marcador de peso molecular Low Range (Bio-Rad); carril 2: primera elución con imidazol 0.01M; carril 3: segunda elución con imidazol 0.025M; carril 4: tercera elución con imidazol 0.05M; carril 5: cuarta elución con imidazol 0.1M; carril 6: quinta elución con imidazol 0.25M; carril 7: sexta elución con imidazol 0.5M.

Producción y purificación de α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

Se utilizaron 1000 ml de medio MRS con dmidón para crear a *Lactobacillus amylovorus*, se centrifugó el medio para eliminar las células, se recuperó el sobrenadante, el cual fue filtrado en un filtro de 0.45 μm para eliminar partículas suspendidas, ya que se utilizó un equipo de FPLC con una columna de afinidad para purificar la amilasa utilizando β -dídodextrina como ligando, en la **Fig. 26** se puede observar la amilasa pura

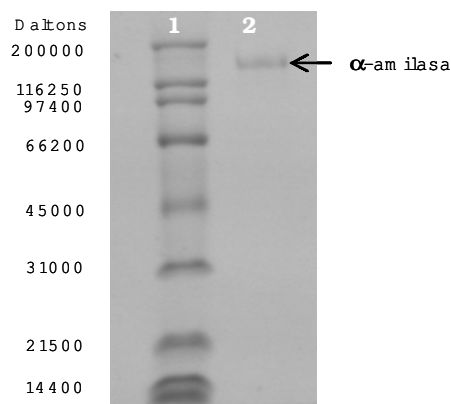


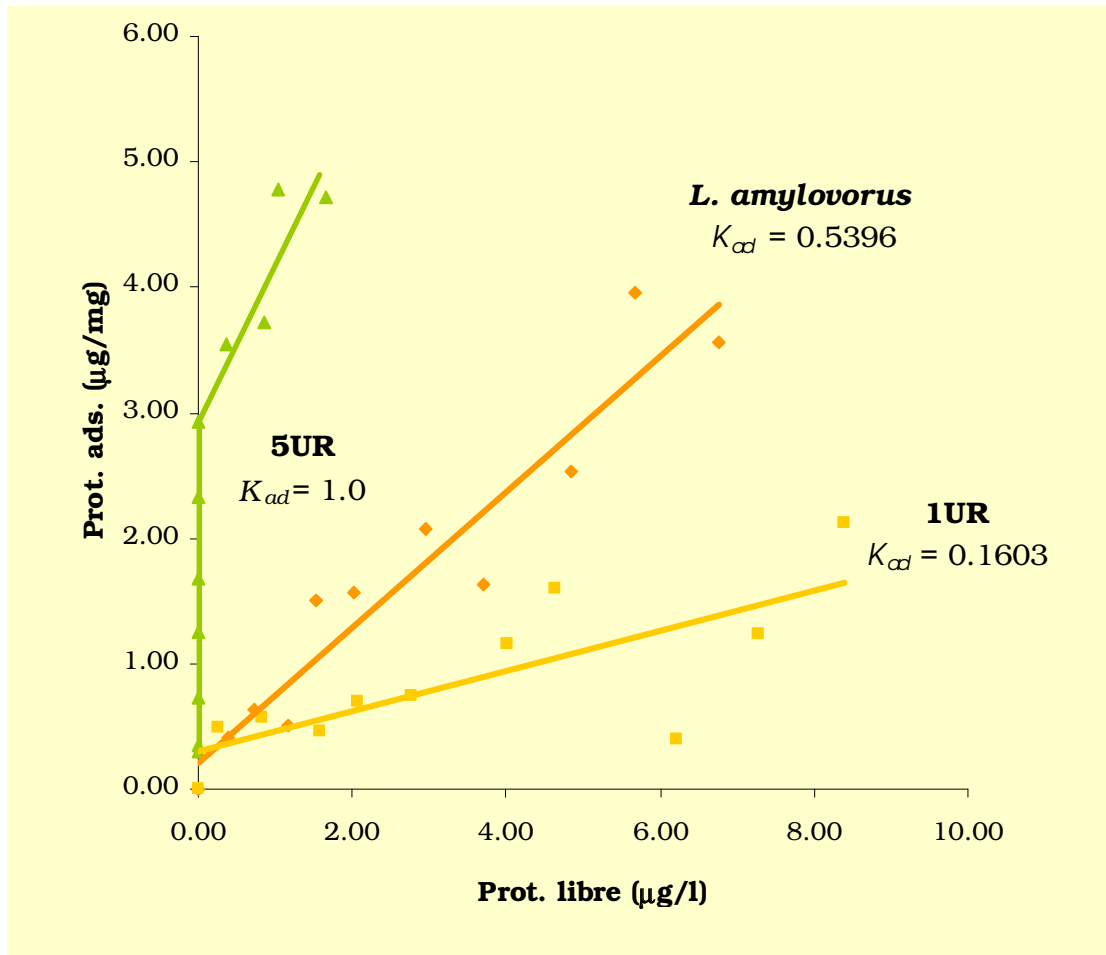
Fig. 26. Purificación de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Carril 1: marcador peso molecular Broad Range (Bio-Rad) y carril 2: α -amilasa pura

Una vez purificadas las proteínas, se dilizaron en un tampón de citratos-fosfatos pH 5, para eliminar el imidazol o la β -dídodextrina, según fuera el caso. Se determinó la absorbancia de cada una de las proteínas a una DO_{280} , para la proteína correspondiente a 1 UR se obtuvo una Abs_{280} :0.786, para las 5 UR una Abs_{280} :1.047 y para la α -amilasa una Abs_{280} :1.188. Conociendo los valores de absorbancia y el coeficiente de extinción molar se aplicó la ecuación de Lambert-Beer ($\lambda: \epsilon \cdot C \cdot L$) para calcular la concentración final de cada muestra, de esta manera se obtuvo que la concentración de 1 UR fue de: 532 mg/L (3.8499×10^{-5} mol/L), de las 5 UR de: 554 mg/L (1.0256×10^{-5} mol/L) y para la amilasa de 600 mg/L (5.7203×10^{-6} mol/L).

Ensayos de Adsorción al sustrato

Los ensayos de fijación de las proteínas al sustrato insoluble se realizaron en una suspensión de almidón de maíz en tampón de citratos-fosfatos (Tp Cit-Ph) pH 5 a 4°C, como se había establecido para la amilasa de *L. amylovorus*.

Los ensayos se realizaron por triplicado, con 11 muestras diferentes. La concentración de la proteína adsorbida se calculó por la diferencia de proteína presente en el sobrenadante de las muestras con almidón y la proteína presente en las muestras sin almidón (blancos).



Gráfica 1. Curva de adsorción al almidón insoluble, 1 UR (●), 5 UR (●) y la α -amilasa de *L. amylovorus* completa (●).

En la **gráfica 1** se puede observar que 5 UR se fijan mejor al sustrato que 1 UR y aún que la amilasa completa. Se confirmó el comportamiento de adsorción de 1 UR realizando un segundo ensayo por triplicado, se obtuvieron valores similares.

Para comparar la adsorción de las proteínas se calculó la pendiente inicial de las curvas obtenidas, valor conocido como constante de adsorción. Para 1 UR su $K_{ad}= 0.16$ es tres veces menor que la de la amilasa entera, $K_{ad}= 0.53$, y 8 veces menor que la de las 5 UR, $K_{ad}= 1$, la cual es a su vez dos veces mayor que la de la amilasa. Cabe señalar que cuando las 5 UR se adsorben completamente al gránulo hasta una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de adsorción momento en que aparentemente se comienza a saturar el sustrato lo cual se identifica como un cambio en la pendiente de la curva de adsorción.

DISCUSIÓN

Análisis de la estructura del gen AmyA de los Lactobacilos

Entre las enzimas que degradan carbohidratos, algunas contienen un sólo dominio con actividad catálitica y otras tienen múltiples dominios donde uno es el dominio de fijación al polisacárido. Ya se ha explicado que la estructura general de la región carboxilo terminal en estos *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. manihotivorus* y *L. amylovorus*) es distinta a la reportada para el DFA de las amilasas, ya que a diferencia de las otras, contiene unidades repetidas muy grandes, directas e idénticas. Hasta el momento, sólo en otra α -amilasa, la de *Bacillus sp.* no. 195 se han encontrado dos secuencias repetidas de aproximadamente 90 aminoácidos cada una, casi idénticas y también responsables de la fijación y degradación del almidón insoluble (Sumitani *et al.*, 2000). Sin embargo en otros sistemas como el de glucosiltransferasas de *Streptococcus* (Lis *et al.*, 1995), la β -1,4 glucanasa de *Cellulomonas fimi* (Tomme *et al.*, 1996) y xilanasas de *Clostridium thermocellum* (Fernandes *et al.*, 1999) las unidades repetidas aparecen más frecuentemente y con el papel bien definido de fijación a un carbohidrato y en ocasiones a diferentes sustratos, por ejemplo en una xilanasas de *Cellulomonas fimi* se encuentran dos dominios de fijación a xilano, uno con afinidad a xilano y otro a celulosa (Simpson *et al.*, 1999).

Análisis de la estructura de 1 UR

Como se explicó, los dominios de fijación a carbohidratos han sido clasificados de acuerdo a su estructura primaria en 39 familias. En dos miembros de la familia 20, se han establecido 2 sitios de unión a maltosa en base a estudios de estructura por cristalografía y resonancia magnética nuclear (Penninga *et al.*, 1996; Sorimachi *et al.*, 1996). En estos sitios los residuos W543, W590, Y527 y Y556 intervienen directamente en la fijación al sustrato.

comparar con la adsorción de la amilasa entera se observa que esta última presenta una K_{ad} tres veces mayor, indicando que conforme aumenta el número de UR también aumenta su capacidad de adsorción. Además, si comparamos estas dos contra la adsorción de las 5 UR observamos que en las etapas iniciales las 5 UR se fijan por completo al sustrato obteniéndose una K_{ad} de 1, valor mayor que el observado para la amilasa entera y una 1 UR. Estos resultados muestran que la proteína formada por 5 UR constituye a un auténtico dominio de fijación con función y plegamiento autónomo.

En este punto habría que resaltar que las 5 UR que corresponden al DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* y la misma amilasa entera, no se adsorben igual al gránulo. La explicación más inmediata la encontramos en la presencia del dominio catiónico, el cual pudiera estar provocando un impedimento estérico entre el DFA y la molécula de almidón, evitando que se adsorba mayor cantidad de proteína. Ya que bajo las condiciones en que se realiza la adsorción la α -amilasa no es activa, por lo que el efecto observado no es una desviación causada por la hidrólisis del sustrato (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000).

Se observó que 1 UR se adsorbe en menor medida que las 5 UR, lo que sugiere que juntas tienen un efecto sinérgico o sumatorio que idealmente optimiza la fijación, como en el caso del dominio de fijación a quitina (DFQ) de una quitinasa extracelular de *Aeromonas hydrophila* Jp101 en donde se encontraron tres dominios en adición al dominio catiónico, implicados en la fijación de quitina insoluble y con efectos sinérgicos en quitina coloidal (Wu *et al.*, 2001).

Relaciones filogenéticas del gen AmyA de Lactobacilos

Los α -amilasas de *Lactobacillus amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihottivorans* comparten una alta identidad, lo que podría indicar que tienen un antecesor común, hasta el momento se sabe que la amilasa más cercana es la α -amilasa de *Bacillus subtilis* ya que comparten un 65% de identidad y un 59% con la amilasa de *Streptococcus bovis* (Morlon-Guyot *et al.*, 2000). En cuanto a la identidad de secuencia de la proteína con 1

UR y las demás secuencias de amilasas es de 30% para *Bacillus subtilis*, 34% para *Streptococcus bovis*, 11% para glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* y 12% para glucoamilasa de *Aspergillus niger*, estos porcentajes se obtuvieron del alineamiento que se presenta en la figura 28.

Es probable que entre los genes de los tres *Lactobacillus* hayan ocurrido subsecuentes recombinaciones, duplicaciones, o mutaciones, permitiendo que acumularan secuencias repetidas y, como se observó con los resultados obtenidos en este estudio, la adsorción al sustrato de estas secuencias repetidas tienen un efecto sumatorio o sinérgico, por lo que probablemente las duplicaciones les confieren una ventaja adaptativa al degradar mejor el almidón insoluble. Este tipo de eventos (mutaciones, recombinaciones) parece ser también el origen de unidades repetidas en otras proteínas con dominios de fijación a carbohidratos como es el caso en glucosiltransferasas de *Streptococcus sp* y en toxinas de *Clostridium difficile*, en las cuales estas unidades repetidas también se encuentran en el extremo carboxilo terminal y comparten cierta similitud (Wren, 1991; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992).

Se ha reportado que en *Streptococcus* es posible que ocurra conjugación de elementos cromosómicos y transposición en la que los transposones son transferidos por conjugación (Horaud *et al.*, 1991; Tribuquot *et al.*, 1991) lo que muestra que en bacterias lácticas es fácil que ocurran eventos de recombinación genética por conjugación y sea esta el origen de la acumulación de unidades repetidas en el gen que codifica para la amilasa de estos tres lactobacilos.

CONCLUSION

- ♣ Los 91 aminoácidos que forman 1 UR son capaces de adsorberse al gránulo de almidón.
- ♣ Las 5 UR constituyen un dominio de fijación al almidón (DFA) con una nueva estructura caracterizada por unidades repetidas en tandem.
- ♣ Por lo que se postula que:

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* no contiene un solo dominio de fijación al almidón constituido por 5 UR, sino que cada unidad repetida corresponde a un dominio independiente que puede estar actuando de manera sumatoria o sinérgica en la adsorción, lo que no se ha observado en cualquier otra amilasa.

BIBLIOGRAFIA

1. **Agdi, A., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J. and Hounhouigan, J.** (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85: 512-520.
2. **Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J. P.** (2000). Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzym. Microb. Technol.* 27: 406-413.
3. **Ausubel, F. E., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A and Struhl, K. K.** (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Massachusetts, E.U A.
4. **Borch, E., Berg, H., Holst, O.** (1991). Heterolactic fermentation by homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic culture with complete cell recycle. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 265-269.
5. **Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J. L.** (1998). Transformation of bacteria by electroporation. *TIBTECH.* 6: 303-309.
6. **Creagh, A. L., Koska, J., Johnson, P. E., Tomme, P. Joshi, M. D. McIntosh, L. P., Kilburn, D. G and Haynes, C. A.** (1998). Stability and oligosaccharide binding of the N1 cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* endoglucanase CenC. *Biochem.* 37: 3529-3537.
7. **Czjzek, M., Bolam, D. N., Mosbach, A., Allouch, J., Fontes, C. M. G. A., Ferreirs, L. M. A., Bornet, O., Zamboni, V., Darbon, H., Smith, N. L., Black, G. W., Henrissat, B. and Gilbert, J.** (2001). The location of the ligand-binding site of carbohydrate-binding modules that have evolved from a common sequence is not conserved. *J. Biol. Chem.* 276: 48580-48587.
8. **De Man, J. C., M. Rogosa and M. E. Sharpe.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
9. **Demeter, K. J and Elbertzhagen, H.** (1971). *Elementos de microbiología lactológica*. Sexta edición. Acribia, España 78-83.
10. **Desmazeud, M. J. et Roisart, H.** (1994). *Metabolisme general des bactéries lactiques*. En: Roisart, H. et Luquet, F. M. (Cordonnateurs) *Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. Volume I. Loria France.
11. **de Vos, W. M.** (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.* 2: 289-295.

12. **De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.** (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. *In: Bacteriocins of lactic bacteria* Chapman and Hall. 1-8.
13. **Fernandes, A. C., Fontes, C. M. G. A., Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P., Fernandes, T. H. and Ferreira, M. A.** (1999). Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochem. J.* 342: 105-110.
14. **Giraud, E.** (1993). Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de docteur-mention sciences. Université de Montpellier II, France
15. **Giraud, E., Champeller, A. and Rimbault, M.** (1994). Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4319-4323.
16. **Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B. and Rimbault, M.** (1991). Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 379-383.
17. **Giraud, E. and G. Cuny, G.** (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene.* 198:149-157.
18. **Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
19. **Horaud, T., De Cespédes, G., Clermont, D., David, F. and Delbos, F.** (1991). Variability of chromosomal genetic elements in Streptococci. p. 16-20. *In: Dunny, G. M., Cleary, P. P. and McKay, L. L. (ed.), Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci.* Am. Soc. for Microbiol. USA.
20. **Hiramoya, K. and Rafter, J.** (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbe's infection.* 2: 681-686.
21. **Imam, S., Burgess-Cassler, A., Cote, G. L., Gordon, S. H. and Baker, F. L.** (1991). A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight α -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Curr. Microbiol.* 22: 365-370.
22. **Janeček, S. A.** (2002). A motif of a microbial starch-binding domain found in human genethonin. *Bioinf. Disc. Not.* 18:1534-1537.
23. **Janeček, S. and Ševčík, J.** (1999). The evolution of starch binding domain. *FEBS Lett.* 456: 119-125.

24. **Janeček, S., Svensson, B. and Macgregor, E. A.** (2003). Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *J. Biochem.* 270: 635-645.
25. **Jore J. P. M. and DeParosis, J.** (1993). Studies on the α -amylase of *Lactobacillus amylovorus* as a model for heterologous protein secretion by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, P26.
26. **Juge, N., Le Gal-Coëffet, M. F., Furniss, C. S. M., Gunning, A. P., Framhoff, B., Morris, V. J., Williamson, G. and Svensson, B.** (2002). The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis. *Suppl. Biol. Bratislava* 57: 239-245.
27. **Kagawa, M., Fujimoto, Z., Momma, M., Takase, K. and Mizuno, H.** (2003). Crystal structure of *Bacillus subtilis* α -amylase in complex with carboxymethylated starch. *J. Bacteriol.* Dec.158: 6981-6984.
28. **Kandler, O.** (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *A. van Leeuwenhoek.* 49: 209-224.
29. **Lindgren, S. and Refai, O.** (1984). Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 221-228.
30. **Linder, M. and Teeri, T. T.** (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.* 57: 15-28.
31. **Lis, M., Shiroza, T. and Kuramitsu, H. K.** (1995). Role of C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-5 in glucan binding. *J. Appl. Microbiol.* 61: 2040-2042.
32. **MacGregor, E. A., Janeček, S. and Svensson, B.** (2000). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 1546. 1-20.
33. **Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R. and Utsumi, S.** (1999). Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* β -amylase complex with maltose. *Biochem.* 38: 7050-7061.
34. **Morlon-Guyot, J., Mucciolo-Roux, F., Rodríguez-Sanoja, R. and Guyot, J. P.** (2001). Characterization of the *L. manihotivorus* α -amylase gene. *DNA Seq.* 12: 27-37.
35. **Nakajima, R., Imanaka, T. and Aiba, S.** (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 355-360.
36. **Nakamura, L. K.** (1981). *Lactobacillus amylovorus*, a new starch hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 56-63.

37. **Nakamura, L. K. and Crowell, C. D.** (1979) *Lactobacillus amylophilus*. A new starch hydrolyzing species from swine waste corn fermentation. Dev. Ind. Microbiol. 20: 531-540.
38. **Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. and Takano, M.** (1995). Characterization of starch hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food "Burong isda" and its amylolytic enzyme. J. Ferment. Bioeng. 80: 124-130.
39. **Oxman, T., Shapiro, M., Diver, A., Klein, R., Vazon, N. and Rabinowitz, B.** (2000). A new method of long-term preventive cardioprotection using *Lactobacillus*. Amer. J. Physiol. Heart Circul. Physiol. 278: 1717-1724.
40. **Penninga, D., Van der Veen, B. A., Knegtel, R. M. A., Van Hijum, S. A. F. T., Rozeboom, H. J. Kalk, K. H. Dijkstra, B. W. and Dijkhuizen, L.** (1996). The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. J. Biol. Chem. 271: 32777-32784.
41. **Perdigón, G., Vintiñi, E., Álvarez, S., Medina, M. and Medici, M.** (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria Dairy Sci. 82: 1108-1114.
42. **Rodríguez-Sanoja R.** (2001). Contribution à l' étude des relations structure-fonction des α -amylases de lactobacilles. Tesis pour obtenir le grade de Docteur en sciences des aliments. Université de Montpellier II.
43. **Rodríguez-Sanoja R., J. Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., N. Juge and J.P. Guyot.** (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3350-3356.
44. **Sabo-Rincón., del Rio, G., Santamaria, R. S., Lopez-Munguia, A. and Soberon, X.** (1999). Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase. FEBS Lett. 453: 100-106.
45. **Sambrook, J, Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1998). Molecular Cloning. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press.
46. **Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. and Mikami, B.** (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylase on raw starch granules. Proc. Biochem. 35: 711-715.
47. **Sen, S. and Chakraborty, S. L.** (1984). Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated vegetable wastes. J. Ferment. Technol. 62: 407-413.
48. **Shih, D. S. H and Russell, R. R. B.** (2002). Glucan binding domain of streptococcal glucosyltransferases. Suppl. Biol. Bratislava 57: 129-136.

49. **Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K. J., Fenwick, S. G., Prasad, J., Gopal, P. K. and Gill, H. S.** (2000). Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 44: 213-222.
50. **Simpson, P. J., Bolam, D. N., Cooper, A., Ciruela, A., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J y Williamson, M. P.** (1999). A family IIb xylan-binding domain has secondary structure to homologous family IIa cellulose-binding domain but different ligand specificity. *Struct.* 7: 853-864.
51. **Sorimachi, K., Jacks, A. J., Le Gal-Coëffet, M. F. Williamson, G., Archer, D. B. and Williamson, M. P.** (1996). Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 259: 970-987
52. **Sorimachi, K., Le Gal-Coëffet, M. F. Williamson, G., Archer, D. B. and Williamson, M. P.** (1997). Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Struct.* 5: 647-661.
53. **Steinkraus, K. H.** (1996). *Handbook of indigenous Foods*. 2nd edition. Marcel Dekker Inc. New York.
54. **Sumitani, J., Tottori, T., Kawaguchi, T. and Arai, M.** (2000). New type of starch-binding domain: the repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. No. 195 α -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochem. J.* 350: 477-484.
55. **Svensson, B., Jespersen, H., Sierks, M. R. and MacGregor, E.A.** (1989). Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch degrading enzymes. *Biochem. J.* 264: 309-311.
56. **Svensson, B., Tovborg Jensen, M., Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Bønsager, B., Nielsen, P. K., Kramhøft, B., Prætorius-Ibba, M., Nøhr, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. and Driguez, H.** (2002). Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Suppl. Biol. Bratislava* 57: 5-19.
57. **Tibbot, B. K., Wong, D. W. S. and Robertson, G. H.** (2002). Studies on the C-terminal region of barley α -amylase 1 with emphasis on raw starch-binding. *Suppl. Biol. Bratislava* 57: 229-238.
58. **Tomme, P., Creagh, A. L., Kilburn, D.G. and Haynes, C. A.** (1996). Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochem.* 35: 13885-13894.
59. **Trieu-Cuot, P., Poyart-Salmeron, C., Carlier, C. and Courvalin, P.** (1991). Molecular dissection of the transposition mechanism of conjugative transposons from gram-positive cocci. p. 21-27. *In: Dunny, G. M., Cleary, P. P. and McKay, L. L. (ed.), Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci.* Amer. Soc. for Microbiol. USA.

60. **van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H and Dijkhuizen, L.** (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotech.* 94:137-155.
61. **Vihinen, M. and Mäntsälä, P.** (1989). Microbial amylolytic enzymes. *Critical. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 329-418.
62. **von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Saringen, S., Schulze, J. and Sauerborn, M.** (1992). Comparative sequence analysis of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen Genet.* 233:260-268
63. **Warren, R. A. J.** (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 183-212.
64. **Winkelmann, G.** (1992). *Microbial Degradation of Natural Products.* Vdags Gesellschaft. New York.
65. **Williamson, M. P., Le Gal-Coëffet, M. F., Sorimachi, K., Furniss, C. S. M., Archer, D. B. and Williamson, G.** (1997). Function of conservation in the *Aspergillus niger* glucoamylase I starch binding domain. *Biochem.* 36: 7535-7539.
66. **Wren, B. W.** (1991). A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.* 5: 797-803.
67. **Wu, M. I., Chung, Y. C., Chen, J. P., Chen, C. S y Chang, M. C.** (2001). Identification and characterization of three chitin-binding domains within the multidomain chitin Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5100-5106.

APENDICES

I. vectores de expresión.

I.A. pGEM-B5 vector derivado del p-GEM-T-Easy (Promega), en el que se donó 1 unidad repetida del gen de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* previamente amplificado por PCR (Rodríguez-Sanoja, 2001) (**Fig. 29**).

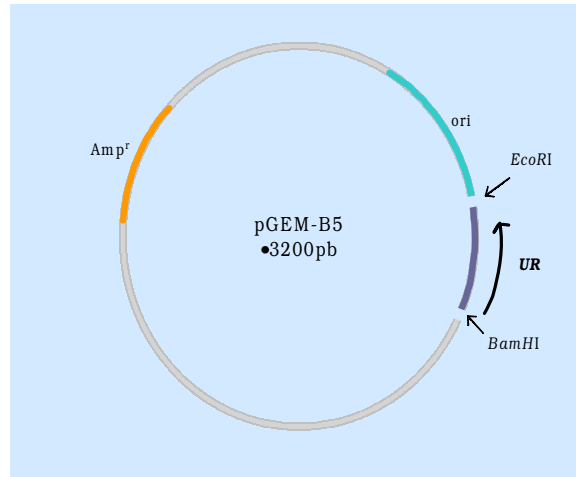


Fig.29. p GEM-B5 vector derivado del vector pGEM-T-Easy en el que se encuentra donada 1 UR.

I.B. pLPCR2-3. En esta figura 30 se observan el mapa del plásmido y los sitios de restricción utilizados para obtener sólo el dominio de fijación al dmidón.

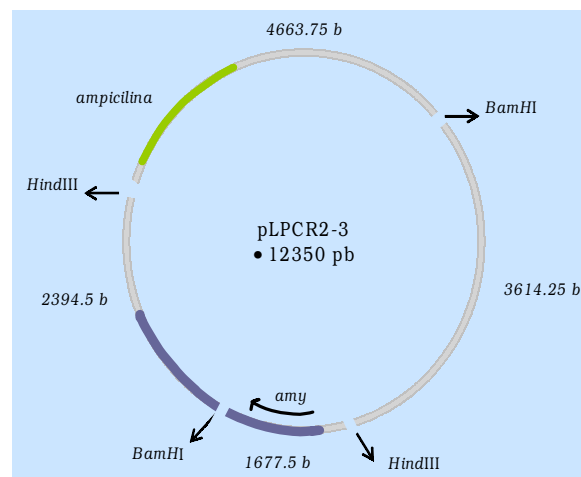


Fig. 30. Vector derivado del pLPCR2 en el que fue donado el gen de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

II. Medios de cultivo

II.A. Medio Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1998).

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar 1.5%(para medio sólido)	15 g/L

II.B. SOC (Sambrook *et al.*, 1998).

Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	0.5845g/L
KCl	0.185 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.03 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.46 g/L
Glucosa	3.60 g/L

II.C. MRS (De Man *et al.*, 1960), Se utilizó para crear *Lactobacillus amylovarus*, este medio está adicionado con almidón para inducir la expresión de la α -amilasa

Peptona pancreática de caseína	10 g/L
Extracto de carne	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Almidón	20 g/L
Citrato de amonio dibásico	2.17 g/L
Acetato de sodio	5 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.207 g/L
Sulfato de manganeso hidratado	0.056 g/L
Fosfato dibásico de potasio anhidro	2.62 g/L

III. Protocolos para ADN

III.A. Extracción de plásmido a pequeña escala por lisis dioxina

Protocolo.

1. Se transfiere el medio de cultivo a tubos de 1.5 ml y se centrifuga a 12000 rpm por 5min a una temperatura de 4°C.
2. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón celular en 100 μ l de la solución I, en seguida se adicionan 200 μ l de solución II, se mezclan bien y se agregan 150 μ l de

solución III, todo el tiempo se debe trabajar en hielo. La mezcla se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo.

3. Al sobrenadante se le adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja a -20°C por 30 min y se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.

4. El sobrenadante se retira y se limpia el botón con 1 volumen de etanol al 70%, después se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.

5. Se retira el sobrenadante y se deja secar el botón a 37°C, por último se resuspende el botón en 10 µl solución de TE (pH 8.0), conteniendo RNAsa (20 µg/ml), y se incuba a 55°C 30 min.

<i>Solución I</i>	<i>Solución II</i>	<i>Solución III</i>
50mM glucosa 25mM Tris.Cl (pH 8) 10mM EDTA (pH 8)	0.2N NaOH 1% SDS	5M Acetato de potasio 60 % Ácido acético glacial 11.5 %

III.B. Extracción de plásmido a gran escala

Protocolo

1. Se colocan 250 ml de medio de cultivo en una botella de centrifuga y se centrifugan a 10000 rpm 10 min a 4°C. El sobrenadante (medio) se retira, y el botón celular se mantiene en hielo.

2. El botón se resuspende en 30 ml de solución I, adicionando 250 µl de RNAsa (10 mg/ml), posteriormente se agregan 60 ml de solución II se mezcla bien y en seguida se añaden 50 ml de solución III. La mezcla se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 4°C.

3. El sobrenadante se recupera y se le añade un volumen de isopropanol para precipitar el ADN, la muestra se deja reposar 30 min a temperatura ambiente y después se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 20°C.

4. Se retira el sobrenadante, y posteriormente se lava el botón en etanol al 70%, se centrifuga a 12000 rpm 15 min a 20°C, se deja secar el botón a 37°C por 30 min-1h.

5. El botón se resuspende en 5 ml de tampón MOPS 50mM pH 7, agregando 50 µl de RNAsa pancreática (10 mg/ml) dejándolo reposar 1 hora a temperatura ambiente, consecutivamente se adicionan 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba a 55°C 1 hora (opcional).

Limpieza de ADN con fenol-doroformo.

1. Se colocan 0.5 ml de ADN en tubos eppendorf, adicionando 0.5 ml de fenol-doroformo 1:1 a la muestra y se agita hasta que se forme una suspensión.
2. Se centrifuga 5 min a 13000 rpm, y posteriormente se recupera la fase acuosa.
3. El paso 1 y 2 se repiten hasta que se halla eliminado el exceso de proteína que se acumula entre las dos fases.
4. Después se agregan 0.5 ml de doroformo-isocámico 24:1, agitando para que se forme la suspensión y se centrifuga 3 min a 13000 rpm.
5. La fase acuosa se recupera y se le añaden un décimo de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla para homogenizar.
6. Se deja precipitar el ADN a -20° C durante 1 hora, a continuación se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante es eliminado.
7. El botón se resuspende en 0.25 ml de etanol al 70%, agitando hasta que el botón se desprenda del tubo eppendorf y se centrifuga 15 min a 13000 rpm y se retira el etanol.
8. Se deja secar el botón a 40° C 30 min ó a temperatura ambiente toda la noche y por último se resuspende la pastilla en 0.20 ml de agua estéril.

<i>Solución I</i>	<i>Solución II</i>	<i>Solución III</i>	<i>Solución de MOPS</i>
5mM sacarosa 10mM EDTA 25mM Tris pH 8.0	0.2N NaOH 1% SDS	3M acetato de sodio pH 4.8	50mM MOPS pH 7.0 750mM NaCl 2mM EDTA

III.C. Purificación de plásmido Mini Kit (Qiagen)

Permite la purificación de ADN usando columnas de gravedad donde la purificación del ADN plasmídico se lleva a cabo por intercambio aniónico. Las propiedades del ADN purificado son equivalentes o superiores a los que se obtienen por gradiente de CsCl, además de que no se utilizan sustancias tóxicas como el fenol, doroformo, bromuro de etidio y CsCl. Este método sólo se utilizó para purificar el ADN que se secuenció.

1. Se reparte la muestra (ADN plasmídico) en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga 10 segundos a 12000 rpm, después se guarda una alícuota de 50 µl de muestra para su posterior análisis.
2. A continuación el tip (columna de gravedad) es equilibrado con 1 ml de tampón QBT, y después se hace pasar por la columna la muestra de ADN plasmídico, una vez que la muestra ya pasó se guarda una alícuota de 50 µl de muestra.
3. La columna se lava 4 veces con 1 ml de tampón QC (este se recupera y guarda en tubos eppendorf).
4. Se pone 0.8 ml de tampón QF (incubado previamente a 65° C) y se recupera el ADN eluido en tubos eppendorf y se guarda una alícuota de 50 µl.
5. Se precipita el ADN con 700 µl de isopropanol, dejándolo reposar 30 min y después se centrifuga a 12000 rpm 15 min a temperatura ambiente.
6. El botón se resuspende en 100 µl de Etanol 70% y se centrifuga 15 min a 12000 rpm.
7. El botón se deja secar a temperatura ambiente ó a 37° C durante 1 hora y por último se resuspende cada botón en 20 µl de agua ultra pura estéril.

III.D. Electroforesis de Agarosa

En la electroforesis se permite la migración de ADN (cuya carga es negativa por la presencia de grupos fosfato) a través de un gel de agarosa que migra del polo negativo al polo positivo como resultado del campo eléctrico formado entre los electrodos sumergidos en el medio. El ADN migra con respecto a su peso molecular y de esta manera se puede identificar su estado y peso molecular.

Protocolo

1. Se prepara una solución de agarosa 0.8% en el buffer TAE, la solución se calienta para que se disuelva, sin dejar agregados suspendidos, posteriormente se adiciona el bromuro de etidio a una concentración final de (0.5 µg/ml).
2. Se coloca la solución en la cámara de electroforesis y se deja que solidifique.
3. La muestra de ADN se mezcla con tampón de carga a una concentración final 1X, y esta es colocada en el gel.

4. La electroforesis se lleva a cabo a 6 voltios/cm hasta que el pigmento haya migrado a $\frac{3}{4}$ partes a lo largo del gel y después se puede observar en el transiluminador de UV, para examinar la migración de fragmentos de ADN y su peso molecular.

Reactivos:

* Agarosa	* Tampón de TAE 50X (Tris, acetato-EDTA)
* Tampón de carga 6X Tipo III:	245 g/L Tris base
0.25% azul de bromofenol	57.1 ml/L ácido acético glacial
0.25% Clonol FF de xileno 4° C	100 ml/L EDTA 0.5M (pH 8.0)
30% glicerol en agua	

III.E. Producción de células de *Escherichia coli* electrocompetentes

La utilización de la electroporación para la transformación de cepos de *E. coli* permite incrementar la introducción de plásmidos a la bacteria. La electroporación o electrotransformación es un proceso en el que las células son sometidas a un campo eléctrico que las hace permeables al ADN. Se postula que en los campos eléctricos de baja intensidad, las membranas de las células se polarizan y que los cambios de campo inducen a un potencial de membrana de 200-400 mVolts, a partir de áreas de desorganización reversible que se van a producir. La ruptura transitoria de membranas la torna permeable a moléculas y macromoléculas (Chassy *et al.*, 1998).

Preparación de Células.

1. Se inocula 400 ml de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37° C con agitación continua por 3 h. hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a 10000 rpm por 15 min a 4° C.
3. Se retira el sobrenadante (medio) y se resuspende el botón en un volumen de agua megapura estéril y fría, después se centrifuga como en el paso 2.
4. El sobrenadante se retira y resuspende en $\frac{1}{2}$ del volumen original del cultivo en agua megapura estéril y se centrifuga a 10000 rpm a 4° C por 15 min.
5. Se retira sobrenadante y se resuspende el botón en 8 ml de glicerol 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm a 4° C por 15 min.

6. Por último se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en un volumen igual al volumen celular de glicerol 10% frío, se diluota la muestra en tubos eppendorf con 50 μ l, almacenándolos a -70° C.

Electro-Transformación.

1. A 50 μ l de células competentes se les adiciona de 1-2 μ l de plásmido y se incuba en hielo por 1 min.
2. La mezcla de ADN y células se colocan en una cubeta de electroporación de 0.1 cm fría
3. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5 mseg y 12.5 kV/cm, y se le da un pulso de 1.25V. Inmediatamente se le adicionan 950 μ l medio SOC (ver *apéndice II.C*) y, rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta
4. Se transfieren las células a un tubo de 15 ml y se incuban a 37° C en agitación continua por 1hr y después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa

IV. Protocolos para proteínas

IV.A. Geles SDS-PAGE.

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras proteicas. En la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel; el tamaño de los poros disminuye con altas concentraciones de acrilamida. La combinación del tamaño del poro del gel y la carga de la proteína, tamaño, y forma determinan el tipo de migración de la proteína.

SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS está cargado negativamente. En este sistema las proteínas tienen carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema.

Protocolo:

a) Preparación del gel:

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, con los separadores y se comprueba de que no haya fugas.
2. Se prepara el gel de acrilamida al porcentaje deseado (gel de separación) y se vacía dentro de las placas, aproximadamente cubriendo 5 cm de altura.
3. Para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.
4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vacía en las placas el gel de concentración, evitando que se formen burbujas dentro las separaciones y entre un gel y otro. Después de la polimerización, los gels están listos para la electroforesis.
6. Se precorren los gels 15 min a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

b) Preparación de las muestras:

1. Se colocan las muestras (en este caso el botón celular) en tubos eppendorf, las células se disuelven en tampón de muestra a una concentración final de 2X y se hierven durante 5 min. Se colocan en hielo, mientras son cargadas en el gel.

c) Condiciones de migración para 2 gels de acrilamida

Los gels se corren 20 mA por gel, durante 1.5 h, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con tampón de migración 1X.

Gels de acrilamida 30%/Bis

Composición	Gel de Concentración 4%	Gel de Separación	
		8%	12%
Acilamida/Bis 30%	0.667 ml	2.700 ml	4.000 ml
Tris.HCl 0.5M, pH 6.8	1.250 ml	—	—
Tris.HCl 1.5M, pH 8.8	—	2.500 ml	2.500 ml
SDS 10%	0.050 ml	0.100 ml	0.100 ml
Agua destilada	2.973 ml	3.280 ml	4.613 ml
Temed	0.010 ml	0.020 ml	6.020 ml
Persulfato de amonio 10%	0.050 ml	0.100 ml	0.100 ml
Total	5.000 ml	10.00 ml	10.00 ml

Tampón de muestra 4x:

Tris.HCl 0.5M, pH 6.8
Glicerol
SDS 10%
2- β mercaptoetanol
Azul de bromofenol

H₂O destilada

Tampón de migración SDS-PAGE, pH 8.3

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

d) Los geles se revelaron tiñendo los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie:

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

IV.B. Western Blot

En el Western blot, la proteína es transferida a una membrana de un gel de acrilamida (SDS-PAGE) después de su separación según su talla. La inmunolocalización permite asegurar la identidad de la proteína expresada con un tdlo de histidinas y confirmar su talla por la comparación con el marcador de peso molecular que contienen 6xHis (6x Ladder) y la detección de algunos productos de degradación que pudieran estar presentes.

Tampón de Transferencia 10X: 144 g/L de Glicina y 30 gr/L de Tris.base

Tampón de Inmunolocalización PBS 10X (Tampón de fosfatos: 0.01M+ NaCl 0.15M)

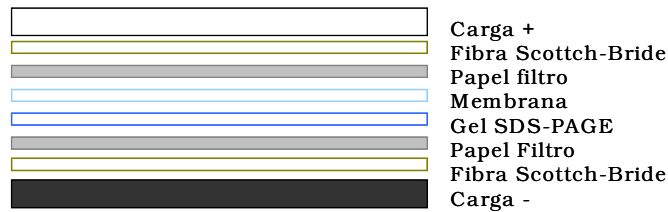
Anti-His ROCHE cat. No. 1922416.

Anti-Mouse IgG (Goat), AP-Labeled NEF821 Perkin-Elmer.

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100 ml del buffer 10X y 100 ml de metanol, se afora a 1 L.
2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer con el tampón de transferencia.

3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma:



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

- Una vez que el sándwich está listo, se sumerge en el tanque del aparato de Western, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.
- Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.
- Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 h, 1 h a 37°C o se puede guardar durante algunos días.

Reconocimiento con Anti-His

- En caso de que no se cuente con marcador de peso molecular con tallo de histidina se sumerge la membrana en metanol para observar las proteínas transferidas, recortando la región donde se encuentra el marcador de peso molecular para ser revelado con azul de bromofenol u otra técnica similar.
- Se prepara el tampón donde se sumergirá la membrana el cual debe tener los siguientes componentes: Tampón PBS 1x, Tween 20 0.05% y Leche descremada 3%.
- El primer anticuerpo (Anti-His) se diluye en el buffer anterior a una concentración final 0.2 µg/ml y se agrega la cantidad necesaria para cubrir la superficie de la membrana. Se incubaba a 15-20°C 1-1.5 h con agitación ligera.
- La membrana se lava por 5 min con 20 ml de tampón PBS 1x/Tween 0.05% 3 veces.
- Se prepara el segundo anticuerpo (anti-IgG) de la misma forma que el primero, quedando a una concentración final 0.2 µg/ml, se incubaba y se lava de igual manera.

Revelado

El revelado se realizó utilizando la actividad de fosfatasa alcalina, que ahora se encuentra complejada al anticuerpo que reconoce el tallo de histidinas.

6. Se agrega 15 ml de BCP/NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina, (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21 g/L y nitro azul de tetrasodio a una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/ Tris buffer) al 80%, y se deja actuar hasta que sean visibles las bandas **(Fig.31)**.

7. La reacción se detiene cambiando el sustrato por agua destilada.

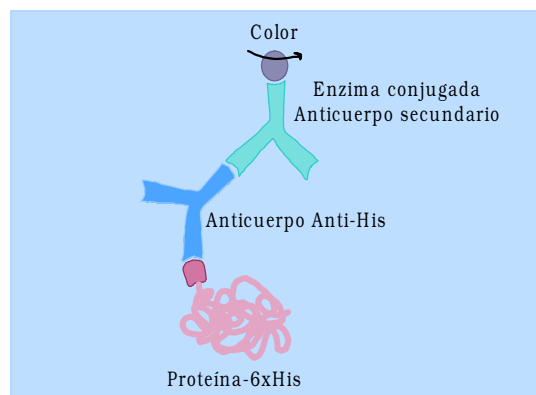


Fig. 31 Detección de proteínas fusionadas a tallos de 6xHis.

IV.C. Purificación de Proteína en columnas de afinidad

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

La purificación de proteínas recombinantes fusionadas a 6 histidinas consiste en cuatro pasos: lisis celular, unión de la proteína a la columna, lavados, y elución **(Fig. 32)**

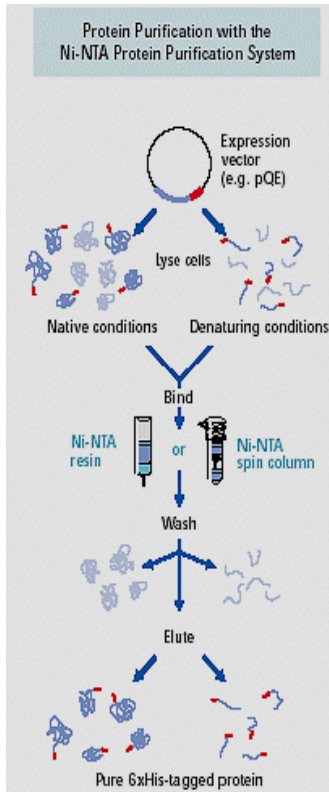


Fig.32 Esquema de purificación de proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis.

Preparación de la columna sefarosa niquelada

1. Se agita el contenedor de la sefarosa para resuspender el gel, se toman 250 μ l de sefarosa y se colocan en un tubo eppendorf, después se centrifuga 3 min A 2.3 rpm y se retira el sobrenadante.
2. Se agregan 5 volúmenes de agua destilada estéril, se agita hasta que se resuspenda, se centrifuga a 2.3 rpm por 3 min y se retira el sobrenadante.
3. Se adiciona $\frac{1}{2}$ volumen de NiSO_4 0.1M agitando por 5min, se centrifuga 2.3 rpm por 3 min, se retira el sobrenadante.
4. Se agregan 5 volúmenes de agua destilada y se agita 5 min; se centrifuga 2.3 rpm por 3 min y se retira el sobrenadante.
5. Se repite el paso 8 y 9 dos veces más.
6. Por último se resuspende la columna en 1 volumen de tampón de fosfatos con 0.05M de imidazol

Rompimiento de las células

1. Durante el proceso del rompimiento celular se mantiene todo en hielo. El botón de 50 ml de células inducidas se resuspende en 300 μ l de solución I (5 μ l de cóctel de inhibidor de proteasas, SIGMA p-2717 de uso general y 995 μ l de tampón de fosfatos (20 mM de Na_2HPO_4 , 0.5M de NaCl y 0.05M Imidazol, pH 7.4*), la suspensión que se forma es sometida a sonicación de 3 pulsos 10 segundos por 1 min de reposo con una amplitud de 60 Hz y se centrifuga a 8000 rpm en frío por 10 min.
2. El sobrenadante se recupera en un tubo eppendorf, y se mantiene en hielo, paralelamente se resuspende el botón en 200 μ l de sol. I, y se somete nuevamente a sonicación de 3 pulsos de 20"/1 min de reposo.
3. Se mezcla el sobrenadante que se recuperó con el sonicado de 2 y se añade tritón al 20%, hasta una concentración final del 1%.

4. El volumen se ajusta a 1 ml con sol. I y se deja en agitación suave durante 1 h, posteriormente se centrifuga a 17000 rpm en frío por 15 min.
 5. Se filtra el sobrenadante en una membrana de 0.45 μm y el filtrado se coloca con sefarosaniquelada, en agitación continua por 5 min a temperatura ambiente.
 6. Se sedimenta el gel por centrifugación a 2.3 rpm por 5 min, el sobrenadante (proteínas no adsorbidas) se recupera y se guardan en un tubo eppendorf para analizarlo en un gel SDS-PAGE.
- * El pH se ajusta con ácido fosfórico

Lavados de la columna

7. Se adicionan 5 volúmenes de tampón de fosfatos con 0.05M de imidazol a la sefarosay resuspende agitándolo 5 min, después se centrifuga a 2.3 rpm por 3 min.
8. Se recupera el sobrenadante y se guarda para análisis en un gel SDS-PAGE.
9. El paso de lavado se repite 9 veces más (guardando el sobrenadante en diferentes tubos para su posterior análisis).

Elución de la columna

10. Se adicionan 2 volúmenes de tampón de elución (20mM de Na_2HPO_4 , 0.5M de NaCl y 0.25M de Imidazol, pH 7.4*), se agita por 5 min y se centrifuga a 2.3 rpm por 3 min.
 11. El sobrenadante (proteína purificada) se recupera en un tubo eppendorf.
 12. Se repite cuatro veces los pasos 10 y 11 (guardando cada elución en un tubo diferente para su análisis).
- * El pH se ajusta con ácido fosfórico

IV.D. Purificación de la α -amilasa con β -cidodextrina

Cromatografía de afinidad:

a) Inmovilización de la β -cidodextrina

1. Se resuspenden 4 g de sefarosa 6B epoxy-activada en 25 ml de agua destilada (1h).

2. Se lava en un vaso con filtro No. 3 (1 h con 400 ml de agua destilada)
 3. Se transfiere el gel a 25 ml de NaOH 0.1M conteniendo 0.3 mM de β -cidodextrina (Sigma). Agitar durante 19.5 h a 45°C (evitando la agitación magnética).
 4. Para finalizar la reacción: son bloqueados los grupos activos restantes: transfiriendo el gel a tampón etanolamina-HCl pH 8. Dejando a 40-50 °C toda la noche.
 5. Se lava con agua destilada 30 min.
 6. Se bloquean los radicales activos que no hayan reaccionado con 200 ml de solución de glucosa al 2.5%, 30 min.
 7. Se lava con agua destilada 30 min y después se hacen tres lavados sucesivos con: 100 ml de tampón de boratos 0.1M pH, NaCl 0.5M y 100 ml de ácido acético 0.1M, NaCl 0.5M.
 8. El gel de β -cidodextrina-sefaroosa 6B se amortigua con tampón citratos-fosfatos 0.1M pH 5.
 9. Se carga el gel en la columna
 - b) *Equilibrar la columna*
 10. Una vez que se colocó la columna en el FPLC y se hacen pasar 100 ml de tampón citratos-fosfatos 0.1M pH 5.
 11. Se pasa por la columna el sobrenadante (fermentación obtenida de *Lactobacillus amylovorus*), previamente filtrado por un filtro de \varnothing 0.45 μ m. Se lava la columna con tampón citratos-fosfatos 0.1M pH 5 hasta que la DO (280nm) de salida sea cero.
 12. Para eluir la proteína se utilizó β -cidodextrina 8mM
- Nota: todas las soluciones fueron filtradas con un filtro de \varnothing 0.45 μ m, además de mantenerlas a una temperatura de 4°C.

IV.E. Ensayos de Adsorción al sustrato.

1. Se lavan 2 gramos de almidón de maíz insoluble tres veces con 10 ml de agua destilada estéril, (se agitó durante 10 min y se centrifuga a 4000 rpm); por último el almidón es resuspendido en 10 ml de buffer de citrato-fosfatos pH 5.0
2. Las muestras se preparan de la siguiente forma:

Tubo	Muestras			Tubo	Muestras Blancos (control)		
	Almidón (μ l)	Tp Cit-Ph (μ l)	Proteína (μ l)		Almidón (μ l)	Tp Cit-Ph (μ l)	Proteína (μ l)
1a	30	0	30	1b	0	30	30
2a	30	4	26	2b	0	34	26
3a	30	8	22	3b	0	38	22
4a	30	12	18	4b	0	42	18
5a	30	16	14	5b	0	46	14
6a	30	20	10	6b	0	50	10
7a	30	22	8	7b	0	52	8
8a	30	24	6	8b	0	54	6
9a	30	26	4	9b	0	56	4
10a	30	28	2	10b	0	58	2
11a	30	29	1	11b	0	59	1

3. Las muestras son incubadas 30 min a 4°C con ligera agitación (6 rpm), posteriormente se centrifugan 5 min a 4°C y se recupera el sobrenadante.

4. La cantidad de proteína adsorbida se obtiene al restar la absorbancia obtenida a 280nm del tubo con almidón y proteína a la obtenida en el tubo blanco (contiene proteína sin almidón). La concentración de las proteínas se obtuvo mediante la aplicación de la ley de Lambert y Beer.

Lista de abreviaciones utilizadas en el texto:

AmyA: amilasa

amyA: gen de la α -amilasa

$\alpha\alpha$: aminoácidos

DFA: dominio de fijación al dmidón

DFC: dominio de fijación a celulosa

DFQ: dominio de fijación a quitina

DFX: dominio de fijación a xilano

GH: glucosil-hidrolasas

IPTG: isopropilthio β -D-galactósido

K_{ad} : constante de adsorción

MFC: módulos de fijación a carbohidratos

UR: unidad (es) repetida (s)

δx His: tallo de histidinas