



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FUNCIONES ADICIONALES DEL
DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN
DE LA α -AMILASA DE *Lactobacillus*
amylovorus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

SUSANA GONZÁLEZ REYES



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUÍA CANALES
Vocal	Prof. JOSÉ GUILLERMO DE J. ÁGUILAR OSORIO
Secretario	Prof. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
1er. Suplente	Prof. AMELIA MA. DE GPE. FARRES GONZÁLEZ SARAVIA
2do. Suplente	Prof. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

El trabajo de este tema fue realizado en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Susana González Reyes
Sustentante

Dra Romina Ma de la Paz Rodríguez Sanoja
Asesora

Contenido

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Justificación	4
Antecedentes	5
1. Almidón	5
i. Forma del almidón	6
ii. Composición química	7
iii. Estructura del gránulo	9
2. Glucósido hidrolasas	11
i. α -amilasas	12
I. Aplicación de las amilasas	12
II. Dominios estructurales	13
II. Regiones conservadas	14
III. Unión del sustrato al sitio activo	15
IV. Mecanismo catalítico	16
ii. Módulos de Unión a Carbohidrato	17
I. Dominios de Fijación al Almidón	18
II. MUC y desestabilización al sustrato	19
3. Fuente de amilasas	23
i. Bacterias lácticas amilolíticas	23
Objetivos	26
Hipótesis	26
Materiales y métodos	27
Resultados	34
Discusión	50
Conclusiones	54
Bibliografía	55
Apéndices	62

Lista de abreviaciones usadas

DFA	dominio de fijación al almidón
UR	Unidad Repetida = Módulo de unión
MUC	Módulo de Unión a Carbohidrato
DUC	dominio de unión a celulosa
GH	Glucósido Hidrolasa
BLA	Bacterias lácticas amilolíticas
IPTG	Isopropil tiogalactosido
DNS	Ácido dinitrosalicílico
FPLC	Por sus siglas en inglés: Fast Protein Liquid Chromatography

Resumen

El Dominio de Fijación al Almidón está presente en las amilasas capaces de hidrolizar el almidón crudo. Este dominio tiene como función principal el acercar a la enzima soluble al sustrato insoluble, sin embargo, existen diferentes reportes que sugieren que dichos dominios pueden desestabilizar al sustrato al interactuar con él y que la desorganización causada facilitaría la hidrólisis. Recientemente se describió el dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, este dominio está compuesto por cinco módulos de secuencia idéntica. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que la adición del DFA completo (5 módulos) o una de sus partes (1 módulo) tiene sobre la hidrólisis del almidón insoluble. Los resultados obtenidos mostraron que el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* y un módulo de fijación causan una disminución en la actividad hidrolítica de la enzima propia del microorganismo, sin embargo, con la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* no se observó un cambio en la forma de hidrolizar al sustrato. Estos datos sugieren que al no haber una mejora en la hidrólisis, el DFA no está provocando una desorganización de la estructura del almidón.

Introducción

Las α -amilasas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos del almidón, dando como productos finales oligosacáridos de longitud variable y dextrinas límite. Las α -amilasas son proteínas multidomínios, el dominio catalítico (A) tiene una conformación de barril (β/α)₈, el dominio B se encuentra entre la tercera hélice alfa y la tercera lámina beta y entre los dos forman la bolsa del sitio activo. El dominio C sigue al barril catalítico estabilizándolo. Además, algunas de estas enzimas presentan un dominio no catalítico conocido como dominio de fijación al almidón (DFA).

Muchos estudios han demostrado que el papel de los dominios de fijación es el posicionar el sustrato insoluble en el sitio catalítico de la enzima para facilitar su hidrólisis. Además algunos autores han reportado que estos dominios pueden facilitar la hidrólisis desestabilizando la estructura de los sustratos insolubles. Un ejemplo es el de una endoglucanasa de *Cellulomonas fimi* en donde se ha observado que el dominio de unión a celulosa (DUC) puede desestabilizar la estructura de las fibras del polímero e incrementar la actividad de la celulasa haciendo al sustrato más accesible para la enzima. Un efecto similar fue descrito con el DFA de la glucoamilasa de *Aspegillus niger* sobre el gránulo del almidón, no obstante, este fenómeno aún sigue siendo un tema controversial, puesto que se ha visto que el DFA de la β -amilasa de *Bacillus cereus* y el dominio de unión a carbohidrato de la xilanasas de *Pseudomonas fluorescens* subps. *cellulosa* no desestabilizan la estructura de los polisacáridos.

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* presenta un DFA con una estructura peculiar, pues está formado por cinco unidades repetidas (UR) que son directas e idénticas, cada una constituida de un centenar de aminoácidos. La función de adsorción al gránulo de almidón del DFA aislado del sitio catalítico ha sido

comprobada y se ha demostrado que cada una de las unidades que lo forman tiene capacidad de unión.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus*, o bien 1UR pueden, además de adsorberse al gránulo de almidón, causar un efecto en la actividad amilolítica de la enzima que pueda ser indicativo de un cambio en la organización estructural del sustrato. Para alcanzar dicho objetivo se estudió como afecta a la hidrólisis del almidón insoluble la adición *in trans* del DFA completo y 1UR usando como sistema hidrolítico la amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y la amilasa de *Aspergillus oryzae*, la cual no tiene dominio de unión propio.

Antecedentes

1) Almidón

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas, las cuales utilizan la energía que les provee este compuesto durante períodos de dormancia o de germinación, hasta que puedan hacer fotosíntesis. Este carbohidrato se localiza en diferentes partes de los vegetales: en las semillas (granos de cereal), en las raíces y tubérculos (tapioca y papa), en el tallo (sago) y en la fruta (plátano) [1].

Desde hace ya mucho tiempo el almidón ha sido parte fundamental en la dieta de la humanidad. Por otra parte, se le ha dado un gran número de usos industriales, en donde modificando física o químicamente los almidones pueden lograrse una multitud de aplicaciones.(Tabla 1)

Tabla 1. Ejemplos de aplicaciones del almidón cuando es modificado.

Usos no alimenticios	Usos alimenticios
Manufactura de papel, cartón	Alimento para bebé
Revestimiento de papel	Galletas, bollos
Absorbentes	Pastas, mezcla para pastas
Adhesivos	Emulsiones
Cerámicos	Mezcla para pasteles, waffles, donas
Tintas y colorantes	Confituras (gomas, jaleas)
Películas biodegradables	Relleno para tartas
Productos farmacéuticos	Glaseados
Lavandería	Mezclas de jugo de carne
Industria textil	Noodles, sopas, mezclas para sopas
	Botanas y otros extruidos de alimentos
	Aderezos de ensaladas
	Retenedores de agua
	Dextrinas, jarabes glucosados

i. Forma del almidón.

El almidón nativo está en forma de gránulo insoluble, este muestra una gran diversidad en tamaño y en forma, que dependen de su origen botánico [2]. El gránulo de almidón presenta otros componentes los cuales son propios de la fuente de cual se obtiene el almidón y que en algún momento se verán involucrados en la degradación del mismo (tabla 2)[4].

La mayoría de los gránulos tienen una forma esférica, aunque algunos son extremadamente alargados o poseen morfología mucho más compleja, por ejemplo, los gránulos tipo A del trigo, centeno y cebada son esferoides planos con una ranura ecuatorial [3].

Tabla 2. Composición, forma y tamaño de algunas fuentes de almidón.

	Maíz	Trigo	Papa	Casava
Tipo	Cereal	Cereal	Tubérculo	Raíz
Forma	Poligonal/ esférica	Esférico/ bimodal	Oval/ esférico	Oval/ truncado
Tamaño(μm)	2- 3	1-45	5-100	4-35
Fosfatos (% v/v)	0.02	0.06	0.08	0.01
Proteína %	0.35	0.4	0.06	0.1
Lípidos %	0.7	0.8	0.05	0.1

Una idea generalizada acerca de cómo se forma el gránulo, es la que considera al *hilum* como punto de partida, en él se da un depósito sucesivo de capas de carbohidratos sobre los lados exteriores del centro (Fig. 1).

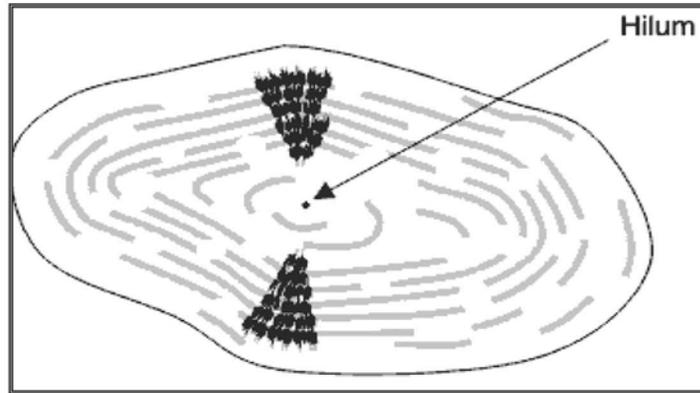


Fig. 1 Hilum punto de partida en la formación del gránulo de almidón.

ii. Composición química.

El almidón es un polímero vegetal construido con la unión sucesiva de unidades de glucosa. El ADP glucosa actúa como sustrato, este es generado en el citosol e introducido al amiloplasto por transportadores específicos en donde se sintetiza el almidón con una variedad de isoformas de las enzimas almidón sintasa y la enzima ramificante del almidón[3].

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos con estructuras similares, la amilosa y la amilopectina.

La amilosa es el producto de la condensación de D- glucopiranosas por medio de enlaces α - 1,4 glucosídicos, que da lugar a largas cadenas lineales con 500 – 2000 unidades y peso molecular de alrededor de 1×10^6 [5]. Este polisacárido es una α -1,4 glucana, cuya unidad repetida es la α -maltosa; tiene la habilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Fig. 2).

Este polímero lineal posee numerosas uniones intra e intermoleculares con puentes de hidrógeno que le dan una estructura casi hidrofóbica, por lo cual tiene baja solubilidad. Muestra un color azul intenso cuando reacciona con el yodo (en su forma $I_2 + I^{-1} \rightarrow I_3$) que interacciona con las hélices.

La amilopectina, se diferencia de la amilosa por las ramificaciones que le proporcionan una forma molecular parecida a la de un árbol; las ramas están conectadas al tronco central (uniones α -1,4) por enlaces α -1,6, localizadas cada 24 a 30 unidades lineales de glucosa [6] (Fig. 2). Su peso molecular varía entre 1×10^7 hasta 1×10^9 . Este polisacárido no puede formar complejo con el yodo, por lo que se produce un color rojo en la reacción.

El almidón en la mayoría de los cereales contiene como promedio 75 % de amilopectina y 25% de amilosa, este valor depende de la fuente botánica empleada. Algunos cereales como el maíz, el arroz, la cebada y el sorgo han sido modificados genéticamente para producir almidón con 95 – 100 % de amilopectina, los cuales son denominados cerosos porque el endospermo tiene esa apariencia [7].

Este carbohidrato es casi insoluble en agua fría y en alcohol, sin embargo, en agua caliente se forma una suspensión coloidal que puede formar un gel cuando se enfría [1].

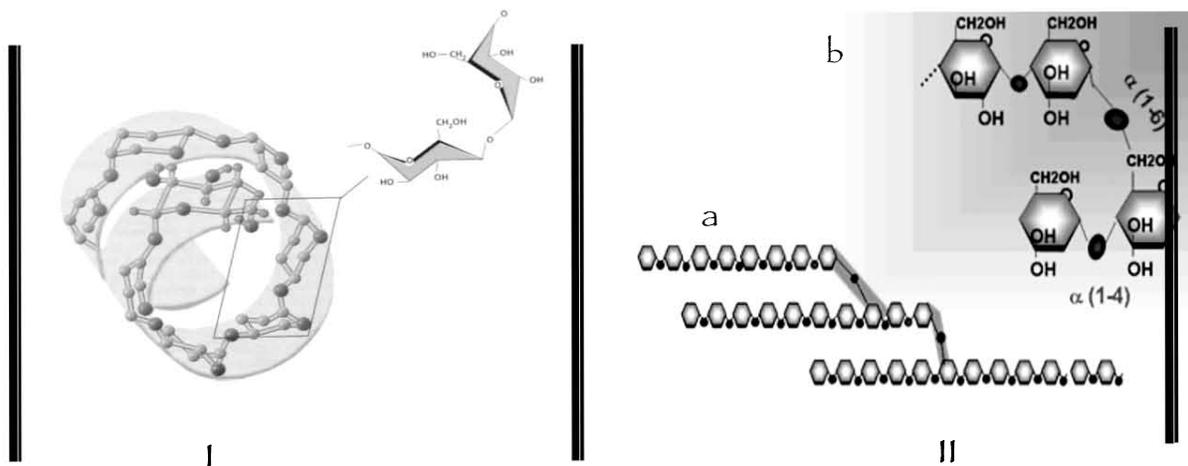


Fig. 2 Estructuras químicas de los componentes del almidón. I. Conformación helicoidal de la amilosa, formada por uniones glucosídicas α -1,4. II. Amilopectina, a) polisacárido ramificado; b) vista de glucosa con enlaces α -1,4 y α -1,6

iii. Estructura del gránulo.

En los gránulos del almidón las moléculas de amilosa y amilopectina están organizadas en diferentes zonas, una es semicristalina y la otra amorfa, éstas forman anillos concéntricos.

La estructura básica del gránulo está dictaminada por el acomodo ordenado de las moléculas de amilopectina, cuando éstas son empaquetadas. En general es aceptado que las cadenas dentro del gránulo están orientadas radialmente con sus extremos no reductores apuntando hacia la superficie y están organizados en regiones amorfas alternadas con regiones cristalinas en estructuras conocidas como lamelas, las cuales tienen una periodicidad de 9 nm[2]. Se cree que esas estructuras forman clusters, los que reflejan la disposición de las cadenas A, B y C[8].

La lamela cristalina está constituida por regiones ordenadas en donde hay dobles hélices formadas por ramificaciones pequeñas de amilopectina. La región amorfa de las lamelas está conformada por amilosa y ramificaciones de amilopectina no ordenadas [9] (Fig. 3).

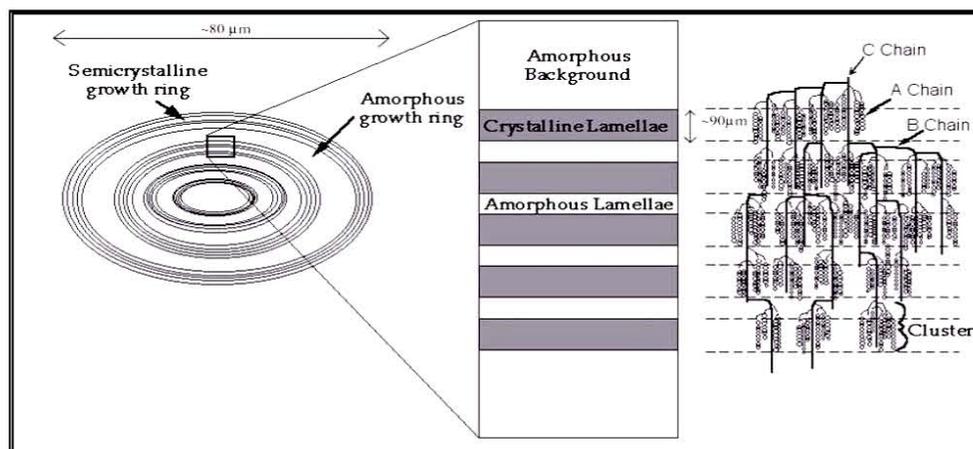


Fig. 3 Representación esquemática de la estructura interna del gránulo de almidón. Formando a los anillos concéntricos están las zonas amorfas y las semicristalinas alternadamente.

La localización de las proteínas, lípidos y amilosa no está determinada con toda seguridad, aunque se cree es muy probable que la amilosa se encuentre en las zonas

amorfos del gránulo, con un aumento de la concentración hacia el exterior de éste. Cuando la amilosa se acompleja con lípidos se afecta la estructura y funcionalidad del gránulo. Los lípidos del almidón comprenden ácidos grasos libres y fosfolípidos. En cereales la formación de este tipo de complejos crea una estructura cristalina débil que refuerza al gránulo [12].

Se cree que un incremento en las interacciones amilosa –amilopectina en esa región causa un decremento en la cristalinidad [10].

Es aceptado que la amilopectina es la responsable de la cristalinidad del gránulo, va de alrededor de un 15- 45 % y puede ser caracterizada por patrones de difracción de rayos X. De acuerdo a esos estudios y modelado estructural de cristales, se sabe que las cadenas de almidón tienen dos estructuras polimórficas tipo A y tipo B, las cuales presentan una estructura monoclinica y hexagonal respectivamente [11] (Fig. 4).

Los almidones de cereales presentan el comportamiento de tipo A, mientras que los tubérculos el de tipo B. La mezcla de los tipos mencionados anteriormente originan el tipo C, el almidón de chícharo en forma nativa presenta este arreglo, en donde el tipo B está en el centro del gránulo y el tipo A en la periferia.

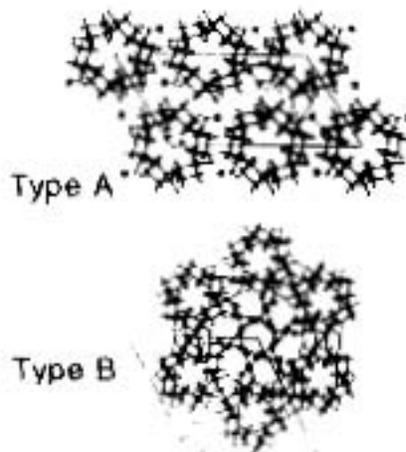


Fig. 4 Tipos de cristales presentes en los gránulos de almidón.

2) Glucósido hidrolasas

Para poder utilizar la energía proveniente del almidón, los organismos deben tener las enzimas necesarias para lograr la hidrólisis de los enlaces presentes en él.

Las O-glucósido hidrolasas (E.C. 3.2.1.-) son un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos o un carbohidrato y una aglicona [13]. La International Union of Biochemistry (IUB-MB) clasificó estas enzimas con base en su especificidad hacia el sustrato y ocasionalmente por su mecanismo molecular, el cual puede ser de retención o inversión de la configuración del carbono anomérico del producto. Recientemente se propuso una clasificación de glucósido hidrolasas (GH) basada en la similitud de la secuencia de aminoácidos[13]. Esta clasificación plantea que al haber una relación directa entre la secuencia y las similitudes de plegamiento, las características estructurales de las enzimas pueden mostrarse todavía mejor haciendo comparación con la especificidad. Asimismo ayuda a descubrir relaciones evolutivas entre estas proteínas y puede ser útil en la búsqueda de nuevos mecanismos de acción [14].

El número de familias dentro de las GH ha ido en aumento en años recientes lo que se refleja en las cien que ya están clasificadas [14] y por la exploración continua en este tema podrían ser aún más.

Debido a que la estructura de las proteínas esta mejor conservada que sus secuencia de aminoácidos, varias familias se han agrupado en clanes que también son conocidas como superfamilias. Algunas de las estructuras que se encuentran en este tipo de clasificación son la $(\beta/\alpha)_6$, $(\alpha/\alpha)_6$, β - jelly roll y β - barril entre otras.

Con tan diversas formas de plegamiento no se entendía como las enzimas podían llevar a cabo la misma función, por lo que con base en estudios cristalográficos se estableció que solamente tres sitios activos eran comunes en la topología de las glucósido hidrolasas: bolsillo (pocket), surco (cleft) y tunel [15]. De esa forma la función básica de las GH está determinada por la topología del sitio activo.

Además, las glucósido hidrolasas poseen diferente grado de especificidad, por ejemplo, las xilanasas de la familia 11 hidrolizan únicamente xilano, y en la familia

10 este mismo tipo de enzimas hidrolizan celulosa y xilano, aunque la magnitud de la hidrólisis es mayor para este último polímero [16]. Algunas amilasas actúan sobre enlaces α -1,4 no así en α -1,6 presentes en el almidón; otras pueden hidrolizar ambas uniones, solo que a diferentes velocidades [17].

Por otro lado, estas enzimas dan lugar a productos diferentes partiendo de un mismo sustrato. Este hecho se relaciona con el número de sitios de unión en el dominio catalítico y con el modo de acción de la enzima [18].

i. α -amilasas.

Las α -amilasas (α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasas EC 3.2.1.1), son endoglucanasas que pertenecen a la familia 13 de las glucósido hidrolasas y al clan H (GH-H) [19]. Estas enzimas son sintetizadas por animales, microorganismos y plantas, su función es catalizar la hidrólisis de los enlaces internos α -1,4 presentes en el almidón, glucógeno y polímeros relacionados [20]. Los productos finales de ellas son oligosacáridos de longitud variable y la dextrina límite.

I. Aplicación de las amilasas

Las amilasas han encontrado un amplio potencial de aplicación en industrias como, la de fermentaciones, farmacéutica, papelera, textiles y alimentaria entre otras.

La industria de la transformación del almidón es una de las principales áreas de aplicación de las amilasas. El almidón nativo es hidrolizado a maltodextrinas por la α -amilasa proveniente de *Bacillus licheniformis*, esta enzima es termoestable. Después de este paso vienen la sacarificación hacia glucosa, esto se logra con la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. La glucosa así obtenida puede ser utilizada como materia prima para síntesis química, por ejemplo en la producción de sorbitol; en procesos fermentativos (ácido cítrico), o puede ser isomerizada a fructosa para la elaboración

de jarabes de alta fructosa, los cuales son usados en gran medida en la industria refresquera [57].

Existen otros usos importantes de la acción de las amilasas en la industria alimentaria, algunos de ellos son [78]:

1. Hidrólisis parcial del almidón para generar dextrinas que son utilizadas como espesantes.
2. Obtención de jarabe de alta maltosa (Glu-Glu) utilizados en la fabricación de la cerveza y confituras (dulces, helados, tortas).
3. Obtención de jarabes de alta glucosa utilizados en la fabricación de cerveza, panes y repostería, confituras y bebidas no alcohólicas.
4. Remoción del almidón utilizado como apresto en la industria textil.
5. Hidrólisis parcial del almidón en la industria panadera para la liberación de glucosa que es sustrato de fermentación de las levaduras para producir el leudamiento de la masa.
6. Hidrólisis del almidón para ser utilizado como fuente de carbono en diversas fermentaciones, entre ellas la producción de etanol para uso alimenticio y combustible.

II. Dominios estructurales.

Las α -amilasas son proteínas multidominio (Fig. 5), el dominio catalítico (también nombrado dominio A) presenta una estructura en barril $(\beta/\alpha)_8$ o TIM, denominado así ya que fue encontrada originalmente en la triosafosfato isomerasa del músculo de pollo [21].

Frecuentemente los loops que conectan las láminas β con las hélices adyacentes llevan residuos de aminoácidos del sitio activo; algunos de estos loops son muy grandes por lo que se han considerado como un dominio. Así un loop largo entre la tercera lámina β y la tercera hélice es el dominio B. El sitio activo se encuentra en una grieta entre el dominio A y el B.

La mayoría de los miembros de esta familia tienen otro dominio, se encuentra enseguida de los dos anteriores y se denomina C; éste está compuesto de

aproximadamente cien residuos de aminoácidos de longitud, tiene un plegamiento de β - sándwich y se cree que estabiliza al barril TIM escudando de los solventes a residuos hidrofóbicos presentes en ese dominio. Por otra parte se ha sugerido que el dominio C puede ayudar a la unión del sustrato [17].

Además, existe el dominio E presente en una gran variedad de enzimas capaces de hidrolizar el almidón insoluble, no todas ellas pertenecen a la familia 13, sino que se hallan también de la familia 15 (glucoamilasas) y algunas de la familia 14 (β -amilasas). El dominio E está involucrado en la capacidad de unir y digerir al almidón insoluble [22, 23] y está clasificado dentro de los módulos de unión a carbohidratos.

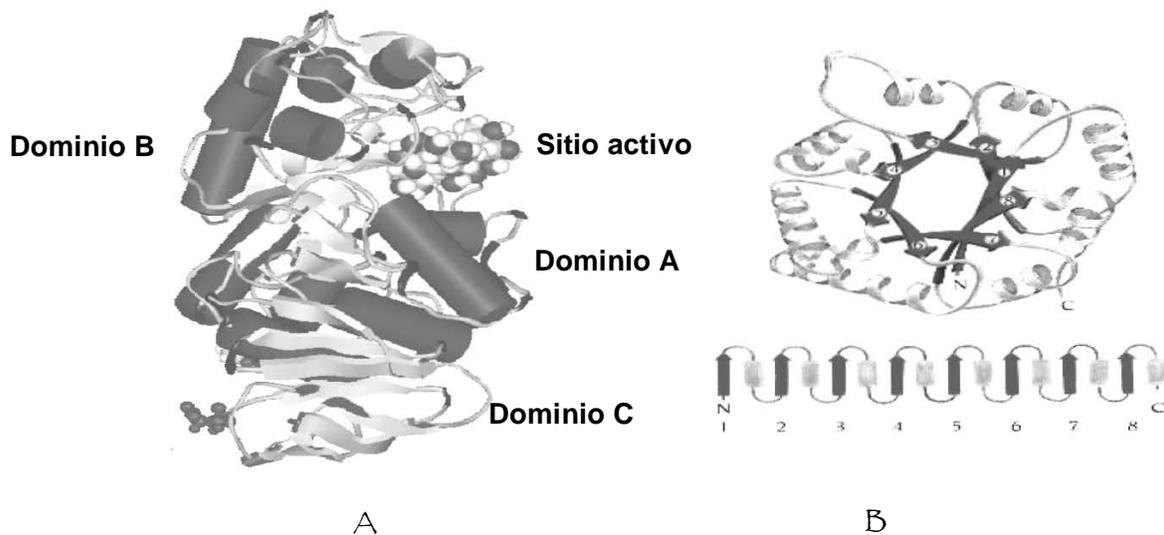


Fig. 5 Dominios representativos de la familia de las α -amilasas. A. Estructura de la α -amilasa de *Bacillus subtilis*. B. Representación esquemática del barril $(\beta/\alpha)_8$ localizado en el dominio A

III. Regiones conservadas

La familia de las α -amilasas muestra en general un bajo grado de similitud en su secuencia. Al hacer una comparación de secuencias de distintas fuentes de α -amilasas, la similitud entre ellas es de alrededor del 10% [24]. Sin embargo, estas

enzimas comprenden algunas regiones bien definidas en su secuencia de aminoácidos, las cuales están altamente conservadas.

Se han encontrado cuatro regiones conservadas. Ellas contienen los tres de residuos de aminoácidos que están involucrados en la catálisis D206, E230, D297 (numeración basada en la secuencia de la taka amilasa TAA) [25]; estos fueron determinados por estudios cristalográficos de rayos X.

La baja similitud de la secuencia primaria de las enzimas de las α -amilasas se manifiesta por el número de residuos invariables, los cuales son diez únicamente. Siete de ellos están implicados en el sitio activo de estas enzima D117, H122, R204 e H296, se encuentran además G56 y P64 situados en la lámina β -2, así como G323 (numeración de TAA)[26].

Es conveniente mencionar que algunas de las secuencias de las regiones conservadas pueden ser usadas como marcadores para discriminar entre miembros de la familia de las α -amilasas que están muy relacionadas tanto en estructura como en función.

Otra región que contiene una característica importante para observar la especificidad de la enzima en especial las α -amilasas, es el segmento alrededor de D175 involucrada en la unión a calcio. Es llamada la quinta región conservada para otros miembros de la familia [27].

IV. Unión del sustrato al sitio activo

El sitio activo de una enzima perteneciente a la familia de las α -amilasas está compuesto de un número variable de sitios de unión al sustrato, los que modifican la actividad catalítica debido a la distancia de ellos y los enlaces que van a ser hidrolizados [23].

Los subsitios están compuestos de cadenas laterales de residuos de aminoácidos situados en los loops de la estructura enzimática que conectan el final del C-terminal de las lámina β con el N-terminal de las hélices adyacentes del barril $(\beta/\alpha)_8$ del dominio catalítico [17].

La nomenclatura estándar de subsitios de unión al sustrato es la nombrada de $-n$ a $+n$, en donde el signo negativo indica el extremo no reductor y el positivo el reductor de la molécula. La ruptura del enlace es posicionada entre los subsitios -1 y $+1$ y el sitio catalítico es denominado -1 . En esta nomenclatura la molécula aceptora puede ser enlazada a el subsitio $+1$, después el enlace se rompe y la reacción tiene lugar [28].

V. Mecanismo catalítico

Las α -amilasas son consideradas como enzimas que retienen la configuración del carbono anomérico en los productos, por un mecanismo de doble desplazamiento (Fig 6).

La maquinaria catalítica de estas enzimas involucra dos carboxilatos catalíticos localizados en lados opuestos del plano de la molécula de glucosa y los que llevan a cabo dos pasos químicos separados. El primero es la glucosilación en donde un grupo carboxílico promueve una reacción de catálisis ácida general, se da simultáneamente la salida del grupo unido a C1 por un ataque nucleofílico del segundo carboxilato para formar un intermediario glucosil-enzima. La desglucosilación es el segundo paso, el primer residuo funciona como base para activar el nucleófilo entrante (una molécula de agua en el caso de hidrólisis y un alcohol en transglucosilación), el cual hidroliza al intermediario. La distancia entre los dos carboxilatos es de aproximadamente 5.5\AA [29].

Por estudios cristalográficos se sabe que el mecanismo involucra un residuo de ácido glutámico como catalizador ácido/base y dos ácidos aspárticos, el primero de ellos actúa como nucleófilo. El papel del segundo ácido aspártico no es claro, pero se ha sugerido que participa en la estabilidad del oxocarbonio del estado de transición y también mantiene al ácido glutámico en el estado correcto de protonación para la actividad.

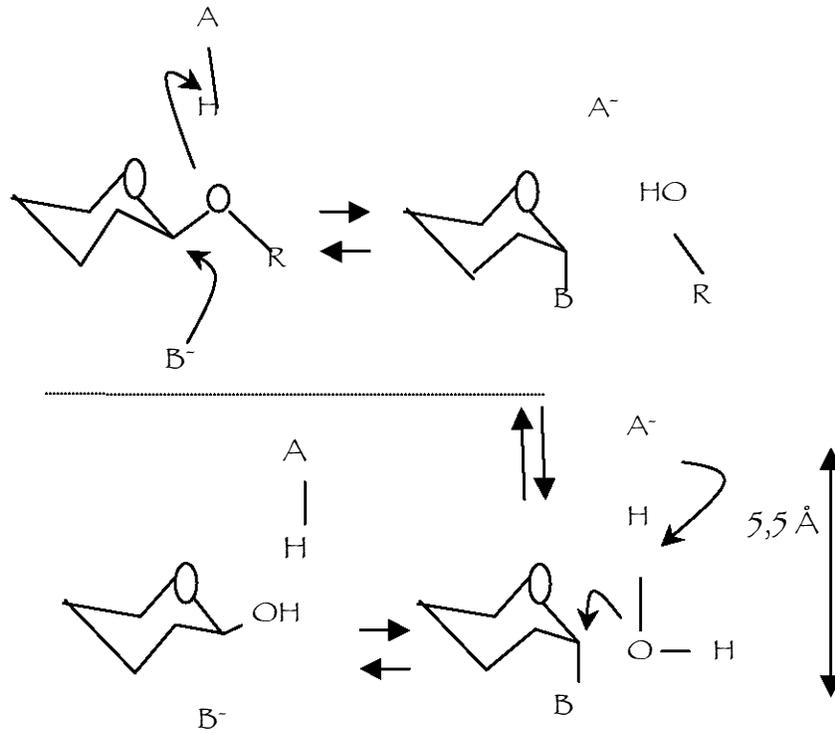


Fig 6. Mecanismo de doble desplazamiento para las enzimas retenedoras de la configuración; A representa un ácido glutámico y B un ácido aspártico. La línea divide los pasos que se llevan a cabo en este tipo de mecanismo.

ii. Módulos de Unión a Carbohidratos.

A menudo las enzimas tienen en su estructura dominios independientes que complementan la función de los dominios catalíticos. Este es el caso de los Módulos de Unión a Carbohidrato (MUC) y son no catalíticos dentro de las enzimas [30].

Los MUC están definidos por ser una secuencia de aminoácidos que posee un plegamiento discreto dentro de las enzimas o proteínas que se unen a carbohidratos (celulosa, xilano, manano, almidón, mezcla de β -glucanas, galactanos, etc.). Estos módulos están agrupados en 43 familias basadas en la similitud de la secuencia de aminoácidos [14].

Los MUC fueron originalmente clasificados como dominios de unión a celulosa (DUC), pues se conocían varios módulos que se unían a este polímero de diferentes hongos y bacterias.

La longitud de estos módulos depende de su origen, por ejemplo para la familia I de los DUC, específica de hongos la longitud normal es de 30 a 40 aminoácidos, sin embargo, el valor promedio para los MUC es en general de un centenar de aminoácidos [31].

La estructura predominante de estos dominios es la de láminas β . La unión al sustrato es dominada por interacciones hidrofóbicas entre los azúcares y los residuos aromáticos sobre la superficie de los sitios de unión [32]. Se ha mostrado que la orientación y la naturaleza de los aminoácidos en los sitios de unión pueden desempeñar una función importante en la especificidad de ligando [33].

La presencia de MUC permite aumentar la velocidad de catálisis por llevar al sitio catalítico a una asociación prolongada y directa con el sustrato.[34]

I. Dominios de fijación al almidón.

Los dominios de fijación al almidón (DFA) pertenecen a seis familias diferentes de acuerdo con la clasificación de los MUC. Dentro de ellas la número 20 es la más generalizada y ha sido estudiada con gran detalle; contiene 120 proteínas diferentes y la función de unión al almidón insoluble ha sido demostrada en varios casos [35].

Solamente alrededor del 10 % de las amilasas y enzimas relacionadas tienen DFA [36]. Este dominio se encuentra generalmente posicionado en el carboxilo terminal, las excepciones son los dominios de las amilasas de *Rhizopus oryzae* [37], *Arxula adenivorans* [38], *Thermoactinomyces vulgaris* [39] que se localizan en posición amino terminal.

Los DFA consisten de algunos segmentos de láminas β que forman una estructura de barril beta-distorsionado. Esta estructura es la responsable de habilitar a la amilasa para unirse y digerir el almidón nativo [40].

Se conocen tres funciones de los DFA en las amilasas: 1) permite la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima en solución; 2) lleva al sustrato hacia el sitio activo en el dominio catalítico; 3) en algunos casos desestabiliza la estructura del gránulo del almidón [41].

En ciertas α -amilasas el DFA provee de termoestabilidad a la enzima, aparte de unirse al sustrato insoluble [42]; aunque este hecho no se ha visto en glucoamilasas. Se ha demostrado que el DFA separado del dominio catalítico retiene su función [43].

II. MUC y desestabilización al sustrato.

Hace más de 50 años Reese y colaboradores [44], hicieron uno de los primeros postulados acerca de la degradación enzimática de la celulosa nativa hacia azúcares solubles. Éste proponía la actuación de un componente no hidrolítico denominado C_1 , que se pensó era el responsable de la desestabilización de la estructura de la celulosa haciendo al sustrato más accesible para la enzima (C_x). (Fig. 7).

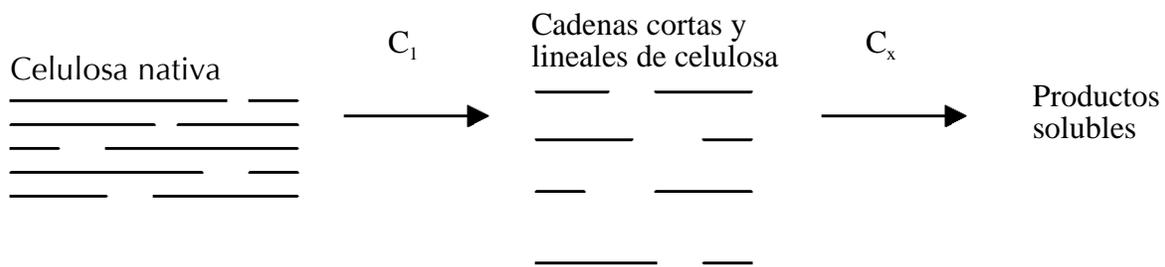


Fig. 7 Interpretación del modelo original del sistema celulolítico $C_1 - C_x$, propuesto por Reese

La función de C_1 no era clara, pues se creía que tenía relación con los enlaces presentes en la celulosa.

Para lograr esclarecer las dudas existente se hicieron experimentos con el DUC de la endoglucanasa A (Cen A) de *Cellulomonas fimi*. Se encontró que este dominio es capaz de desestabilizar la estructura de las fibras de celulosa, llevando a una liberación de pequeñas partículas, esto sin actividad hidrolítica detectable [45, 46]. Este fenómeno fue demostrado en otros DUC de familias relacionadas.

Además se sabe que los DUC de Cen A y C_{ex} una exo-β.1,4-glucanasa de *C. fimi* previenen la floculación de la celulosa cristalina bacteriana; en otras palabras el DUC dispersa al sustrato [79].

Por lo que, se propone los dominios independientes interactuarían sinérgicamente en la hidrólisis de la celulosa por desestabilización física de las fibras [47].

Sin embargo, la desestabilización del sustrato no se ha encontrado en todos los sistemas. En trabajos realizados con la xilanasa A de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* que posee un DUC tipo II, no han observado la liberación de pequeñas partículas de la superficie del algodón, esto es, la desestabilización no es significativa [48]. Este hecho se repite en con el tipo X de DUC de la xilanasa A de ese mismo microorganismo [49].

Los sitios de unión a la celulosa de los tipos I, II, III, y V de los DUC consisten de una región hidrofóbica planar sobre la superficie de los dominios, en donde la unión está mediada por interacciones debidas a los residuos aromáticos expuestos y las cadenas de glucosa. En particular se mencionan triptófanos y tirosinas que se encuentran conservados dentro de los sitios de unión y si falta alguno de ellos no se da la interacción [50, 51, 33].

En el casos de los sistemas de degradación del almidón nativo, solo se tiene evidencia de un DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* que puede desestabilizar los gránulos. En los ensayos para probar la capacidad de disrupción se empleó al DFA incubado con almidón insoluble y se verificó la hidrólisis del sustrato siguiendo la liberación de glucosa tanto con el dominio catalítico como con la glucoamilasa completa. Los resultados obtenidos señalan que hay una disminución de la actividad hidrolítica cuando se usa la amilasa completa, pero una mejora significativa en las mezclas que contenía concentraciones bajas del DFA con el dominio catalítico [52].

Algunas de las ideas generadas alrededor de la glucoamilasa son las bases para entender como se puede dar el proceso de desarreglo en la estructura del almidón.

El DFA de la glucoamilasa de *A. niger* está unido al dominio catalítico por un linker glicosilado compuesto primordialmente de residuos de serina y treonina, la

estructura secundaria del dominio consiste de ocho láminas β arregladas esencialmente en forma antiparalela que da lugar a una proteína bifacial, este dominio tiene dos sitios de unión al sustrato (Fig. 8) [53].

El sitio 1 tiene una forma compacta, rígida y una superficie hidrofóbica expuesta (por los aminoácidos W543 y W590), con un espacio intra-cadenas apropiado para la unión de los enlaces α -1,4 de glucosa. Este sitio se presenta casi invariable en la unión, lo que podría indicar su participación en el reconocimiento inicial del sustrato.

Mientras tanto el sitio 2 está más extendido que el 1, además sufre cambios conformacionales en la unión. Las interacciones dadas en este sitio están mediadas por tirosinas (527 y 556); se le involucra en una fuerte unión, que prepara al sustrato para la catálisis (Fig. 9)[54].

Estudios sobre la unión del DFA a la β -ciclodextrina (análogo de las hélices de amilosa) muestran que las dos cadenas de almidón están unidas casi perpendicularmente. Esto ha sugerido que la orientación de los sitios de unión pueden forzar a las cadenas a separarse y así incrementar la superficie disponible para la hidrólisis [55].

Con microscopia de fuerza atómica (AFM) se apoyó la idea de la posición de los sitios. Pues se sugirió que el DFA puede actuar como un puente en las cadenas de amilosa para dar la unión y causar un mayor cambio en la conformación. Y con mutación dirigida en los sitios de unión se comprobó que se requieren los dos para lograr la deformación eficiente del almidón [56]

La presencia de dos sitios de unión es un punto importante al considerar la desestabilización del gránulo de almidón pues ensayos realizados con en DFA de la β -amilasa de *Bacillus cereus* var. *cereus* muestran que al tener solo un sitio es difícil especificar si hay un desarreglo de la estructura o al menos que sea notable, aunque la estructura secundaria sea parecida a la presentada por los MUC de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y de la CGT asa de *Bacillus circulans* quienes cuentan con dos sitios de unión [41, 80].

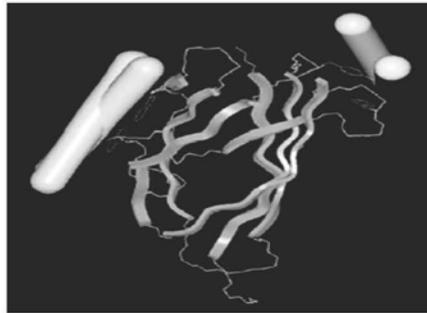


Fig. 8 Estructura secundaria del DFA de la glucoamilasa de *A. niger* en la que se tienen los dos sitios de unión.

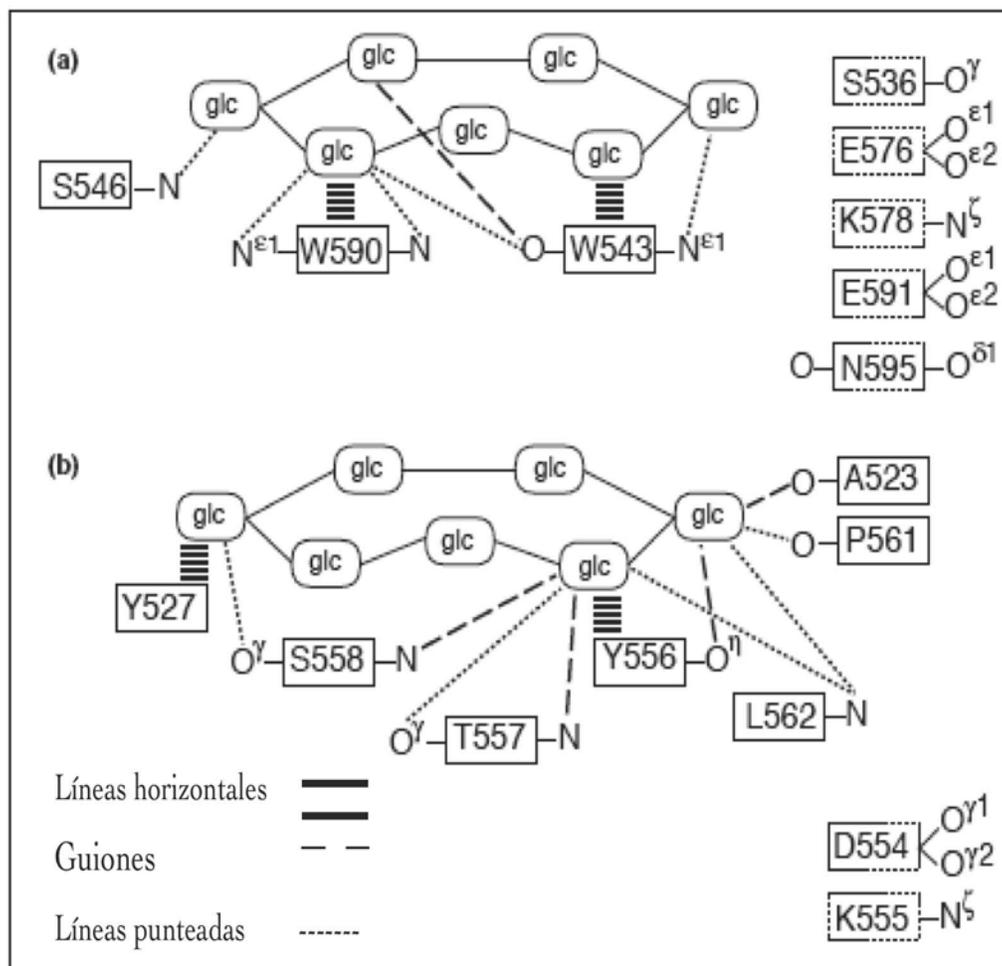


Fig. 9 Interacciones que se producen entre el dominio de fijación al almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y las cadenas de glucosas. a) sitio de unión 1, b) sitio de unión 2. Las interacciones hidrofobas están representadas por líneas horizontales gruesas entre el azúcar y el anillo aromático; los enlaces de hidrógeno directos están mostrados como guiones; las líneas punteadas simbolizan posibles enlaces de hidrógeno mediados por agua.

La idea de una segunda función para estos módulos de unión a carbohidrato está siendo aún un tema polémico, pues la desestabilización por parte de los MUC, solo se ha presentado en las enzimas de *C. fimi* y *A. niger* sobre los sistemas celulosa y almidón respectivamente.

3) Fuentes de amilasas

Las amilasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, aunque también en plantas y animales. Las amilasas identificadas en microorganismos son la α -amilasa y la glucoamilasa, mientras que la β -amilasa se encuentra generalmente en plantas [58].

i. Bacterias lácticas amilolíticas (BLA).

Las bacterias lácticas son bacilos y cocos Gram-positivos, no-formadores de esporas, sus colonias son muy pequeñas de color blanco-lechoso. Estos microorganismos son anaerobios facultativos y dan negativos en las pruebas de catalasa, nitrato reductasa y citocromo oxidasa [59]. Requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas), esto es, tienen unas posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuye a reducir el rendimiento de su crecimiento. Obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares y dependiendo de las condiciones de cultivo y de la especie bacteriana estos microorganismos producen ácido láctico como producto único (vía homofermentativa) o mayoritario de su metabolismo (vía heterofermentativa) [60]. *Streptococcus* y *Lactobacillus* constituyen géneros importantes de este tipo de BLA. Algunas de estas bacterias son importantes en la industria alimenticia como productoras de quesos, yogurt, leches ácidas, pepinos fermentados, chucrut, para curar pescado, carne y embutidos entre otros. Este tipo de bacterias se utilizan para la conservación de alimentos, ya que el pH ácido producido en la fermentación láctica inhibe la microflora patógena y a los microorganismos responsables de la

alteración de la calidad de los productos.

Algunas especies son flora normal del cuerpo humano (se encuentran en la cavidad oral, tracto genital y vagina).

La actividad amilolítica es una característica inusual en este tipo de bacterias. No obstante, bacterias del género *Lactobacillus* han sido aisladas de diferentes fuentes y áreas geográficas, muestra de ello son: raíces fermentadas de cassava en el Congo y Níger (*Lactobacillus plantarum* [61]), fermentaciones de residuos de maíz utilizados en la ganadería en Estados Unidos (*Lactobacillus amylophilus* [62] y *Lactobacillus amylovorus* [63]) y durante la fermentación de la masa de maíz en Benin (*Lactobacillus fermentum* [64]). Otras cepas son: *L. cellobiosus* [65], *L. manihotivorans* [66] y *L. amyolyticus* [67]. También existen cepas amilolíticas de *Streptococcus sp*, *Pediococcus sp*, *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*.

Recientemente se inició la caracterización molecular de algunas amilasas de bacterias lácticas. Los genes de las α -amilasas encontradas en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus manihotivorans* y *Lactobacillus amylovorus* fueron secuenciados.

Los genes de estas amilasas presentan más del 98 % de similitud en su secuencia de nucleótidos, lo que haría suponer una relación equivalente en cuanto a su estructura y función [68]. Ha sido demostrado que los primeros 417 aminoácidos de *L. amylovorus* son suficientes para transferir la capacidad amilolítica a una cepa de *L. plantarum* sin esa característica [69], dejando en claro que la región N-terminal contiene el sitio activo.

Asimismo se observó que hacia la mitad 3' de los genes de las amilasas tenían una estructura formada por unidades repetidas en tandem; cuatro para las amilasas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorans* y cinco para *Lactobacillus amylovorus*. Se propuso que las unidades repetidas podrían ser las responsables de la unión a los gránulos de almidón [70].

Ese es un hecho sin precedentes en amilasas, los casos más cercanos son la α -amilasa de *Bacillus sp.* no. 195, la cual tiene dos unidades repetidas en posición

carboxilo terminal [71]; y la amilasa de *Bacillus halodurans* (C-125) que cuenta con dos módulos de unión al almidón insoluble [72]

Para identificar la función de las unidades repetidas en la amilasa de *L. amylovorus* se compararon las características bioquímicas y la capacidad de hidrólisis de la amilasa integra y una que estaba truncada, es decir, le faltaban las unidades repetidas de la región C- terminal. La principal diferencia entre las dos amilasas fue la incapacidad de la amilasa truncada para fijarse e hidrolizar los gránulos de almidón. Por lo que las unidades repetidas fueron consideradas como un DFA [73].

Recientemente se demostró que en efecto la región de las unidades repetidas corresponde a un dominio de fijación al almidón ya que si se separan del dominio catalítico sigue siendo funcional.

Estudios realizados posteriormente comprobaron que cada una de las unidades repetidas actúa como módulos de unión independientes. Este hecho fue visualizado en ensayos de adsorción a gránulos de almidón, en donde se vio que conforme aumentaba el número de módulos utilizados la cantidad de proteína adsorbida era mayor [74, 75]

Objetivos

General

Estudiar el efecto que la adición del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y uno de sus módulos constituyentes tiene sobre la actividad hidrolítica de almidón insoluble.

Particular

📍 Evaluar el resultado de adicionar *in trans* un módulo y el dominio de fijación al almidón sobre la actividad amilolítica de sustrato insoluble, al utilizar las α -amilasas:

- i. *Lactobacillus amylovorus* que tiene dominio de fijación al almidón y,
- ii. *Aspergillus oryzae* la cual carece de DFA

Hipótesis

Si la actividad amilolítica de las amilasas se ve favorecida por agregar un módulo o el dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* entonces se podría insinuar que hay una función extra de este DFA.

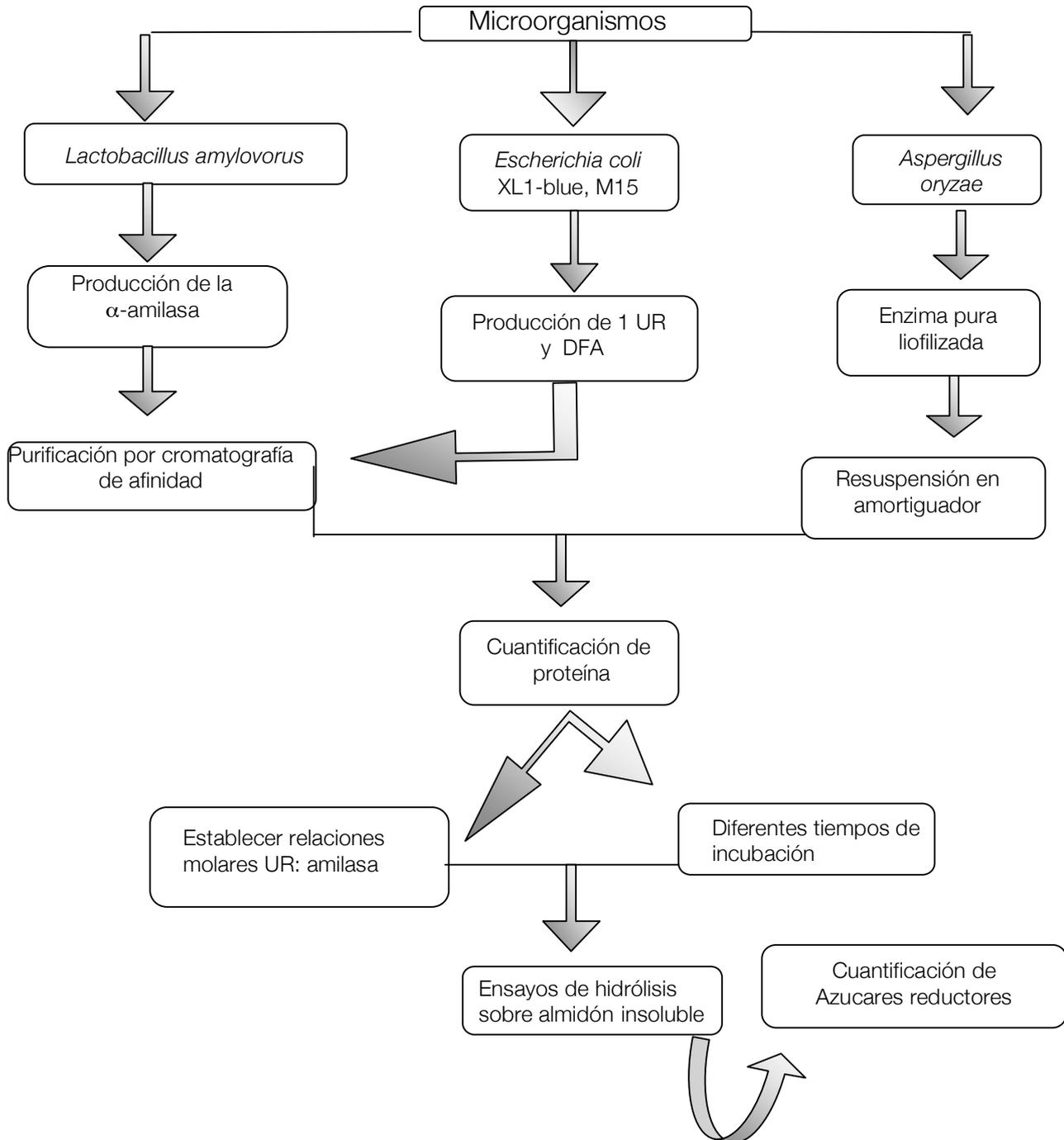
Justificación

El papel que los dominio de fijación tienen en la hidrólisis de sustratos insolubles no se tiene completamente establecido, es claro que mejoran la actividad hidrolítica de enzimas que atacan polisacáridos insolubles, pero no se comprende en su totalidad el fenómeno de la adsorción, la especificidad y de que manera intervienen en la accesibilidad al sustrato, este trabajo pretende contribuir a la comprensión del fenómeno de la hidrólisis del almidón, en el sistema particular de la α -amilasa de *L. amylovorus*, estableciendo si su DFA es capaz de modificar la actividad hidrolítica de amilasas.

Al encontrarse dicha función, se podría pensar en una aplicación orientada a la industria de la transformación del almidón en donde el uso de estas amilasas o su DFA podrían permitir el uso de almidones crudos.

Métodos y materiales

a. Esquema experimental.



b. Características y conservación de microorganismos.

Microorganismo / Vector	Especificaciones
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Cepa NRRL B-4540 Productor de la α -amilasa
<i>Escherichia coli</i>	Cepa XL1-blue contiene el plásmido pQE31-1 con 1 UR <i>SupE44hsdR17recA1endA1 gyrA46thi</i> <i>RelA1lac^c</i> F' [<i>proAB⁺lac^qZAM15Tn10(tet^r)</i>]
	Cepa M15 con pQE31-5 que tiene al DFA <i>Kan^R</i> contiene el plásmido pREP-4 que produce constitutivamente la proteína represora <i>lac</i> . Tiene como marcador el gen de resistencia a kanamicina.
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilasa, liofilizado crudo SIGMA®, 43 U/ mg de sólido. 1 unidad libera 1 mg de maltosa de almidón en 3 min a 20 C pH 6.9
pQE31	Vector de expresión de 3.5 kb, contiene el promotor del operón <i>lac</i> , como marcador tiene el gen de resistencia a ampicilina (Quiagen). Contiene un tallo de histidinas (6xHis) lo que permite identificar y purificar la proteína recombinante

La proteína liofilizada de *A. oryzae* se conservó a -20°C. Las cepas de *Lactobacillus amylovorus* y *Escherichia coli* se mantuvieron en glicerol al 40% a – 70 °C.

c. Obtención y purificación de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

La cepa de *L. amylovorus* se activo en medio MRS con almidón al 2% (ver apéndice) inoculado al 5 % (v/v) a partir de un glicerol, ésta se cultivó por 24 h a 29 °C sin agitación. Un volumen de 250 mL de medio se inoculó con el 1% de la cepa activada y se dejó crecer por 18 h bajo las condiciones de temperatura y agitación anteriores. El caldo de cultivo se centrifugó a 12000 rpm en frío y se obtuvo el sobrenadante al que se le adicionó inhibidor de proteasas [cóctel de uso general SIGMA], manteniéndose en refrigeración hasta el momento de filtrarlo.

La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad, utilizando el sistema de FPLC (por sus siglas en inglés) (ver apéndice). Todas las soluciones utilizadas fueron filtradas por membrana con poro de 0.45 μm y desgasificadas.

La columna de afinidad que estaba constituida de sefarosa [sefaroa 6-epoxi-activada, Pharmacia Biotech] y β -ciclodextrina [SIGMA] como ligando, fue equilibrada con amortiguador de citratos–fosfatos 100 mM pH 5. Una vez listo el sistema se pasó el sobrenadante a un flujo de 0.5 mL/min, la elución se realizó con β -ciclodextrina 8 mM.

La pureza de la de proteína se verificó en un gel de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método de Laemmli [76], revelado con azul de Coomasie (ver apéndice) .

La actividad de las fracciones fue medida a través de la hidrólisis sobre almidón soluble [almidón soluble de papa PROLABO]. La cuantificación de los azúcares reductores liberados se realizó por el método DNS (ver apéndice), utilizando una solución de glucosa [SIGMA] 5.5 mM como estándar.

d. Producción de 1 módulo de fijación y del DFA.

Las cepas de *E. coli* XL1-blue (pQE31-1) y M15 (pQE31-5) que contenían los genes para 1 UR y el DFA respectivamente sirvieron para producir los péptidos correspondientes. En ambos casos se realizó un preinoculo en medio LB (ver apéndice) adicionado con los antibióticos necesarios para cada cepa con los distintos plásmidos (Tabla 1), cada uno de éstos se dejó crecer por 14 h a 29 °C y 180 rpm de agitación.

Tabla 3. Antibióticos adicionados a cepas.

Cepa/ plásmido	Condiciones (concentración final)
XL1-blue –pQE31-1	Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
M15-pQE31-5	Kanamicina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Un litro de medio LB con los antibióticos respectivos se inoculó al 1% (v/v) y se dejó crecer toda la noche. La inducción de las proteínas se realizó con IPTG [SIGMA] a una concentración 0.4 mM por 8 h, pasado ese tiempo se cosecharon las células por centrifugación a 10000 rpm 10 min a 4 °C. Los paquetes celulares fueron lavados con amortiguador de fosfatos 20 mM imidazol 0.05 M, pH 7.4 y guardados en congelación.

Para comprobar la presencia de las proteínas requeridas antes de la purificación se realizó un gel SDS- PAGE y un western blot (ver apéndice), con el cultivo sin inducir y las muestras inducidas.

e. Purificación de péptidos (1 y 5 UR).

Los paquetes celulares se resuspendieron en amortiguador fosfatos pH 7.4 con imidazol 0.05 M e inhibidor de proteasas y se rompieron por sonicación (ver apéndice) se recuperó el sobrenadante con las proteínas de interés y las muestras se filtraron a través de una membrana con poro de 0.22 μ m. Lo anterior se llevó a cabo en frío.

La purificación de las proteínas se realizó por cromatografía de afinidad usando columnas de sefarosa niquelada (ver apéndice).

Las proteínas se visualizaron en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie y se determinó la concentración de proteína por la ley de Lambert – Beer, leyendo la absorbancia a 280 nm.

Los coeficientes de extinción molar que se utilizaron fueron:

1 UR: 20 416 L/ mol cm

5 UR: 102 080 L/ mol cm

f. Actividad de α -amilasa.

Almidón soluble. Este ensayo se llevó a cabo con 80 μ L de almidón soluble (12.5 g/L) y 10 μ L de amilasa, la mezcla se dejó incubando por 10 minutos y la reacción se detuvo con 10 μ L de NaOH 2 N. Los azúcares liberados se cuantificaron por el

método del DNS (ver apéndice). Una unidad de actividad amilolítica fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares reductores por minuto.

Los ensayos se realizaron en condiciones de pH y temperatura óptimos para cada amilasa, pH 5 y 64°C para la amilasa de *L. amylovorus* y pH 5 a 40° C para la amilasa de *A. oryzae*. Al ser ésta última una enzima liofilizada, se debieron buscar las condiciones para trabajar en los ensayos de hidrólisis, dos concentraciones 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína liofilizada se usaron para elegir la que diera una mejor curva de actividad y la liberación de los azúcares se siguió durante 60 minutos para establecer el comportamiento de la actividad amilolítica.

Almidón insoluble. Para estos ensayos se preparó una suspensión de almidón de maíz [SIGMA] a una concentración de 12.5 g/L, se lavó el sustrato tres veces con agua estéril y fría para eliminar la parte soluble que pudiera estar presente, finalmente se dejó en amortiguador de citratos-fosfatos 100 mM pH 5.

Los ensayos se realizaron de la misma manera que sobre almidón soluble a pH 5 y a la temperatura óptima de cada enzima. Se mezclaron 80 μL del almidón y 20U de la amilasa en un volumen de 10 μL y agua para completar los cien. La mezcla se dejó incubando por diferentes tiempos (0, 10, 15, 30, 60 y 120 min) y la reacción se detuvo con la adición de 250 μL de DNS. Se continuó con la técnica para la cuantificación de azúcares reductores (ver apéndice). Antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro, los tubos fueron centrifugados 10 minutos a 12000 rpm para sedimentar el almidón y evitar cualquier interferencia.

g. Cuantificación de proteína.

La cantidad de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (ver apéndice) utilizando albúmina sérica bovina [BSA, SIGMA] como estándar, mientras que las α -amilasas puras se cuantificaron por su absorbancia a 280 nm con la ley de Lambert – Beer: $A = \epsilon cl$

En donde:

A: absorbancia a 280 nm (adimensional)

ϵ : coeficiente de extinción molar (L/ mol cm)

c: concentración (mol/L)

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

El ϵ teórico de la α -amilasa de *L. amylovorus* es 207 680 L/ mol cm y el de *A. oryzae* de 107650 M⁻¹ cm⁻¹.

h. Efecto sobre actividad hidrolítica del gránulo de almidón.

Con el objeto de saber si la adición del DFA tenía algún efecto sobre la hidrólisis se realizaron diferentes mezclas molares con cada una de las amilasas por separado y el DFA o una UR según fuera el caso.

La suspensión de almidón de maíz (1 mg) y el DFA (desde una concentración de 1E⁻⁷ a 1E⁻¹⁰ μ moles) fueron incubados en amortiguador citratos-fosfatos pH 5 a 64°C durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos; cada mezcla contenía una relaciones molares diferente (1:1, 1:0.2, 1:0.1, 1:0.01, 1:0.001) basada en relación amilasa-DFA. Enseguida se añadieron 10 μ L de la enzima completa (a 20U) y se dejó incubando 10 minutos más para proceder cómo en una clásica cuantificación de actividad. En el caso del ensayo con la α -amilasa de *L. amylovorus* y 1UR se procedió de la misma manera que con el DFA.

El segundo ensayo se realizó con la α -amilasa de *A. oryzae* y el DFA. Se incubo el almidón insoluble (1 mg) con el DFA (2E⁻⁶ a 2E⁻⁹ μ moles) en amortiguador citratos-fosfatos pH 5 a 40°C, durante 0, 15, 30 y 60 minutos, posteriormente se mezcló la enzima en cuatro diferentes relaciones molares (1:1, 1:0.1, 1:0.01, 1:0.001). Enseguida se añadieron 20U (2E⁻⁶ μ moles) de la enzima del hongo y se dejó incubando 10 minutos más para iniciar con en la cuantificación de actividad. En el caso del ensayo con la α -amilasa de *A. oryzae* y 1UR se realizó según lo descrito para el DFA.

La cinética de la hidrólisis del sustrato insoluble por parte de las enzimas solas se realizó cada vez que se hicieron los ensayos de mezclas, como un control de la enzima. Cada ensayo se efectuó de manera independiente dos veces y cada uno por triplicado.

i. Análisis estadístico.

Para establecer la significancia de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza para un diseño experimental con dos factores. La hipótesis nula establecida fue que el factor (A=relaciones molares, B=tiempo de incubación) no tiene un efecto sobre la manera de hidrolizar al sustrato insoluble.

Cuando se encontró que existe diferencia en alguno de los estadísticos F se hizo un análisis de comparación múltiple aplicando el método de Dunnet [77].

Resultados

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

L. amylovorus fue crecido en medio MRS con almidón por 18 h; de este cultivo se obtuvo del sobrenadante que contenía la α -amilasa.

La enzima se purificó por cromatografía de afinidad (Tabla 4), sobre sefarosa- β -ciclodextrina. La amilasa eluyó a partir de los veintidós mililitros, el tiempo anterior corresponde al volumen muerto de elución. La columna es altamente específica puesto que solo se liberó la enzima de interés.

La actividad amilolítica de la muestra se determinó por el método del DNS en las fracciones colectadas de la purificación (Fig. 10). Por otro lado, se confirmó la presencia de únicamente una proteína en un gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes con tinción de Coomasie (Fig. 11).

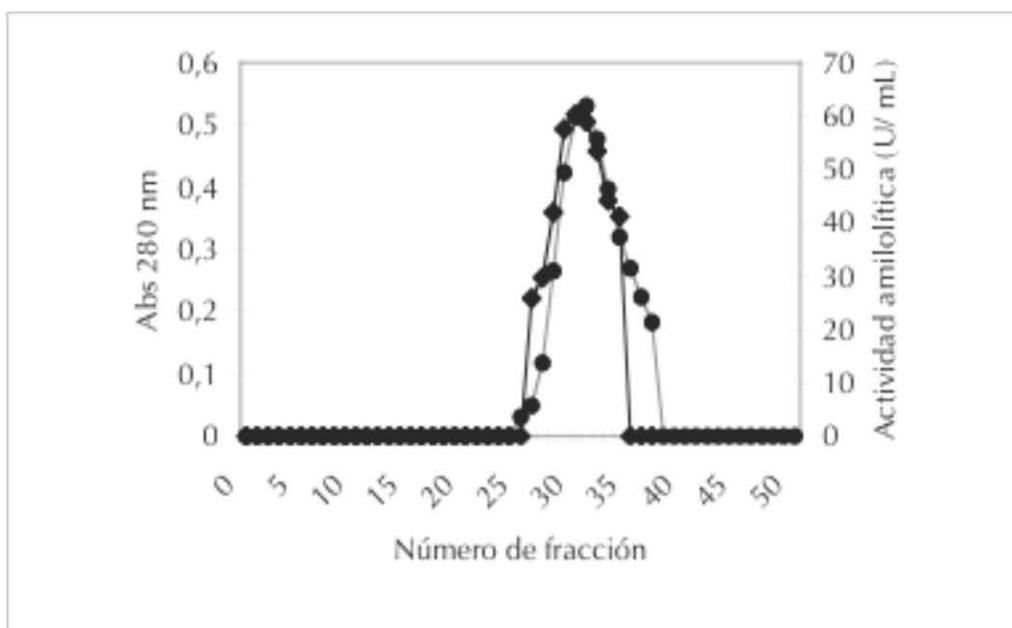


Fig. 10 Perfil de elución de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. En la gráfica se muestra el pico de purificación (◆) y la actividad amilolítica de esta enzima (●).

Etapa	Volumen	Proteína total	Actividad total	Actividad específica	Purificación	Eficiencia
	(mL)	(mg)	(U)	(U/ mg)	(veces)	(%)
Sobrenadante	200	14.16	390.36	27.56	1	100
Cromatografía de afinidad	10	0.16	313.49	2017.05	73.19	80.31

Tabla 4. Pasos de purificación de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

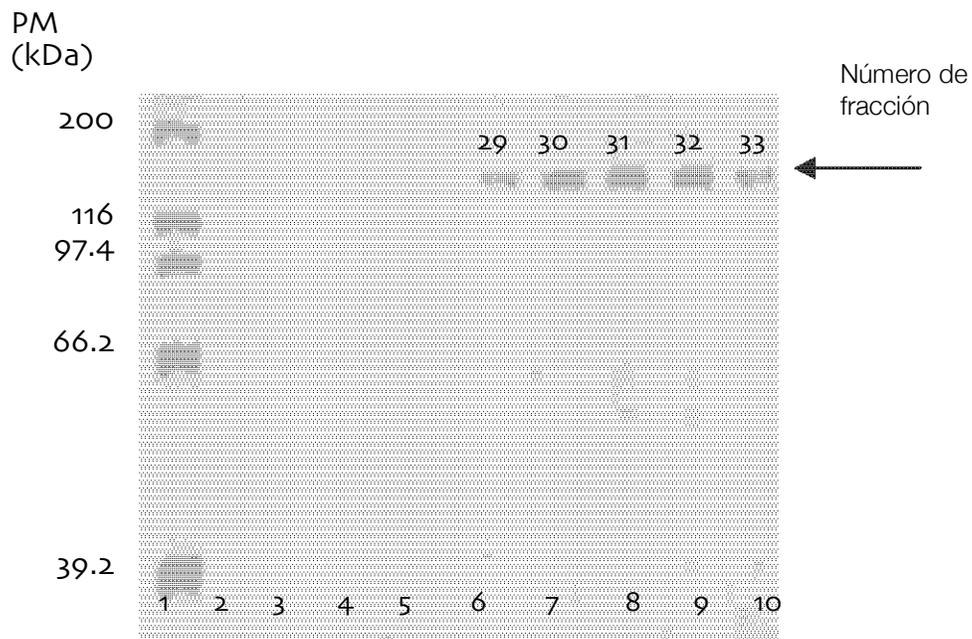


Fig. 11 Fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad en gel de poliacrilamida al 7.5 %- SDS, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular de alto rango Boehringer Mannheim ®; carril 2-10, fracciones de la purificación.

- Obtención y purificación de 1 Módulo y del DFA completo.

Las proteínas correspondientes a uno de los módulos y al DFA se produjeron heterológamente en las cepas de *E. coli* XL1-blue (pQE31-1) y M15 (pQE31-5),

respectivamente. La fusión de un tallo de seis histidinas a las proteínas producidas, fue de gran ayuda para la identificación y purificación de los péptidos correspondientes.

Las células obtenidas después de la inducción se lisaron por sonicación para obtener las proteínas de interés. La presencia de éstas se comprobó con una electroforesis SDS- PAGE, los controles usados fueron los mismos cultivos en ausencia del inductor (Fig. 12).

A su vez se hizo un análisis de western blot para asegurar que se expresaran las proteínas esperadas, esto se llevó a cabo con dos anticuerpos el primero un anti-histidinas que es reconocido por un segundo anticuerpo acoplado a una fosfatasa alcalina que genera una reacción que nos permite observar una banda colorida (Fig. 13).

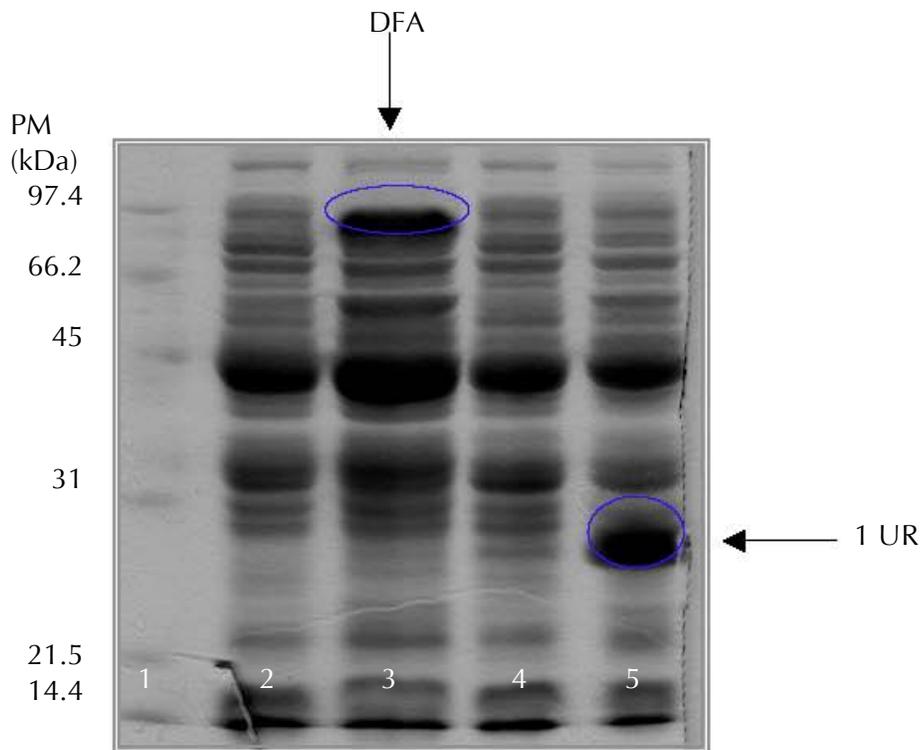


Fig. 12 Gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida con tinción de Coomassie, el cual confirma la presencia de las proteínas de interés. **Carril 1**, marcador de peso molecular de bajo rango (BioRad); **carril 2**, *E. coli* M15-pQE5 sin inducir; **carril 3**, *E. coli* M15-pQE5 inducido; **carril 4**, *E. coli* XL1-Blue-pQE1 sin inducir; **carril 5**, *E. coli* XL1-Blue-pQE1 inducido. Las flechas señalan las proteínas mencionadas.

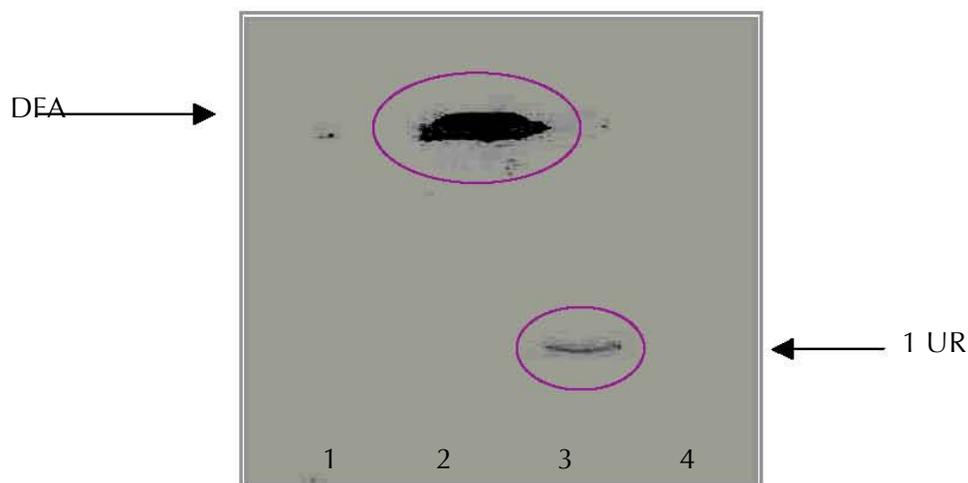


Fig. 13 Wester-blot de péptidos producidos. **Carril 1**, *E. coli* M15-pQE5 sin inducir; **carril 2**, *E. coli* M15-pQE5 inducido; **carril 3**, *E. coli* XL1-Blue-pQE1 inducido; **carril 4**, *E. coli* XL1-Blue-pQE1 sin inducir. Las proteínas de interés se

Como las proteínas eran reconocidas por los anticuerpos se procedió a la purificación de los péptidos en estudio. Esto se realizó por cromatografía de afinidad, usando una columna de sefarosa acoplada con níquel en donde se da la interacción de las histidinas con el metal.

Después de adsorber las proteínas se realizaron lavados con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4 e imidazol 0,05 M, esto con la finalidad de quitar la mayor cantidad de proteínas retenidas de manera no específica. Las eluciones se realizaron a una concentración de imidazol 0,25 M con las mismas condiciones de pH.

Las Fig. 14 A y 14 B muestran los geles SDS-PAGE realizados durante la purificación del DFA, se observa que en los lavados se van eliminando las bandas de otras proteínas adsorbidas mismas que ya no aparecen en la elución, obteniéndose pura la proteína de interés. El proceso de purificación del péptido correspondiente a un módulo de fijación se observa en las Fig. 15 A y 15 B en donde se muestra que la proteína se obtuvo pura desde los últimos lavados.

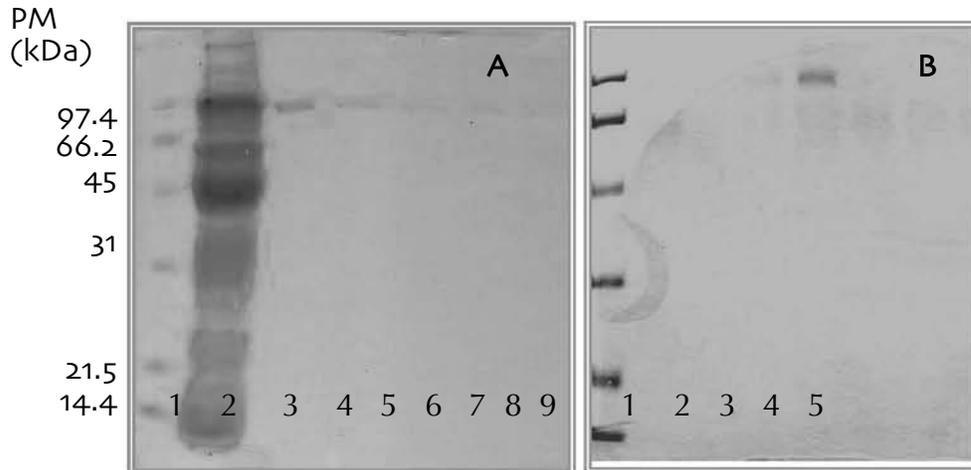


Fig. 14 Geles de poliacrilamida al 10%- SDS para la purificación del DFA. **A:** carril 1, marcador de peso molecular de bajo rango Bio Rad ®; carril 2, proteína no absorbida; carril 3-9 lavados de la columna de afinidad. **B:** carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, últimos lavados; carriles 4 y 5 eluciones de la proteína pura.

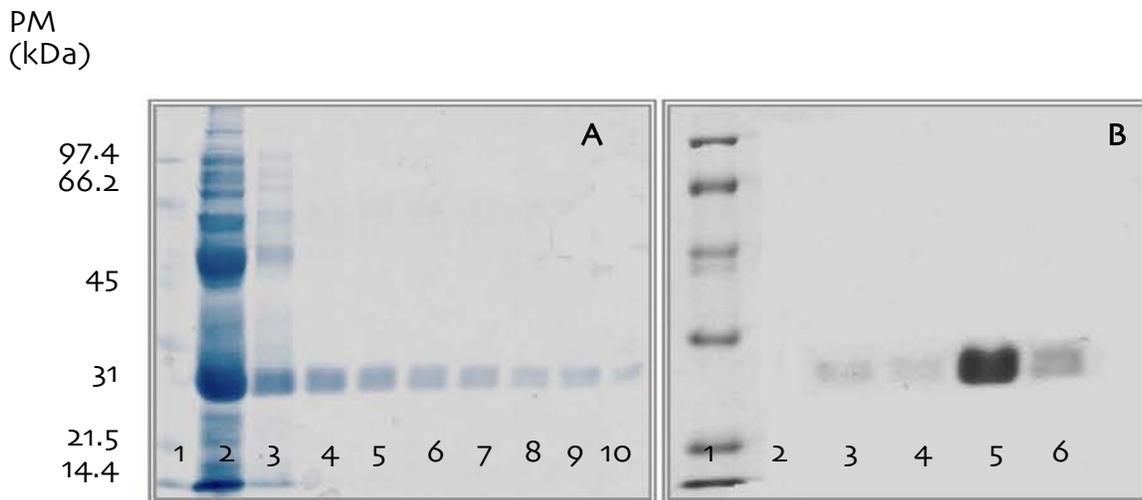


Fig. 15 Fracciones de purificación de 1 módulo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Carril 1, marcador de peso molecular de bajo rango Bio Rad®. **A:** carril 2, proteína no absorbida; carril 3-10, lavados de columna níquelada. **B:** carriles 2 y 3 lavados finales de columna; carriles 5 y 6 eluciones de proteína pura

Las proteínas puras se dializaron contra amortiguador de citratos-fosfatos pH 5, desplazando así el imidazol. El DFA se concentró hasta una absorbancia a 280 nm de 0.19, lo cual se traduce en una concentración de 1.86×10^{-6} M. En el caso de 1 módulo se obtuvo una absorbancia de 0.212 que corresponde a una concentración de 1.03×10^{-5} M.

○ Tratamiento de la α -amilasa de *L. amylovorus*. Hidrólisis de almidón insoluble

Lo primero que se hizo fue encontrar el nivel de actividad catalítica de la enzima con la que se pudiera observar la liberación de azúcares reductores sin confundir con la sensibilidad del aparato utilizado. Para ello se realizó la hidrólisis de almidón insoluble a distintos tiempos, usando una suspensión de almidón de maíz. Se probó primero con 10 U en 10 μ L, basadas éstas en la hidrólisis de almidón soluble. Los datos obtenidos mostraban muy poca liberación de azúcares lo cual podría causar subestimación de los resultados, por lo tanto se decidió manejar el mismo volumen pero con 20 U de la α -amilasa.

La curva de hidrólisis de la amilasa completa que se consiguió bajo esas condiciones se aprecia en la Fig. 16.

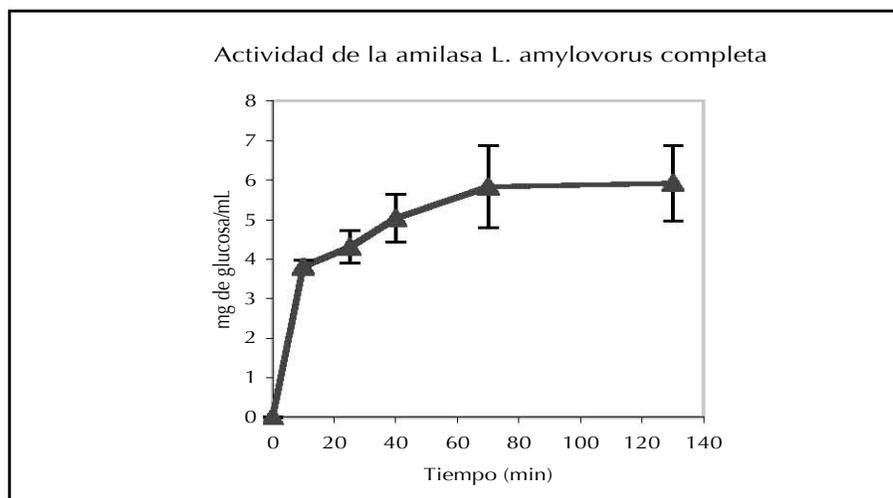


Fig. 16 Liberación de azúcares reductores a partir de almidón insoluble, generada por la α -amilasa de *L. amylovorus* a 20 U de actividad catalítica empleando 0, 10, 25, 40, 70 y 130 min de ensayo.

- Efecto de la adición del DFA sobre la hidrólisis de almidón insoluble presentada por la amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

El objetivo de este trabajo fue identificar el efecto que podría tener el preincubar el DFA con el almidón sobre la actividad hidrolítica de la α -amilasa de *L. amylovorus*. Los tiempos de incubación del DFA con el almidón fueron 0, 15, 30, 60 y 120 min, después de los cuales se adicionaba la amilasa y se dejaba actuar diez minutos que corresponde al ensayo de hidrólisis de la amilasa sola.

Las relaciones molares fueron establecidas tomando como base el concepto que a una concentración elevada del DFA se podría provocar un efecto de inhibición, por ello se considero una relación 1:1 de amilasa-DFA como la más alta con la que se trabajaría y las siguientes fueron 1:0.2, 1:0.1, 1:0.01, 1:0.001, en donde la proteína variable fue la del dominio.

La Fig. 17 muestra la gráfica obtenida de la hidrólisis de almidón de maíz insoluble que fue incubado con el DFA en diferentes relaciones molares a los tiempos manejados, con adición posterior de la amilasa de *L. amylovorus*. En ella se observa como se disminuye la actividad en la mayor parte de las relaciones molares usadas. Sin embargo, con las relaciones molares menores 1:0.01 y 1:0.001 se encontró un aumento en la actividad con respecto a la amilasa sola en dos de los tiempos iniciales.

Se realizó una gráfica de porcentajes de actividad (Fig. 18) de esas dos relaciones molares para observar cual era el aumento presentado y bajo un análisis de varianza decidir si el cambio encontrado mostraba alguna significancia.

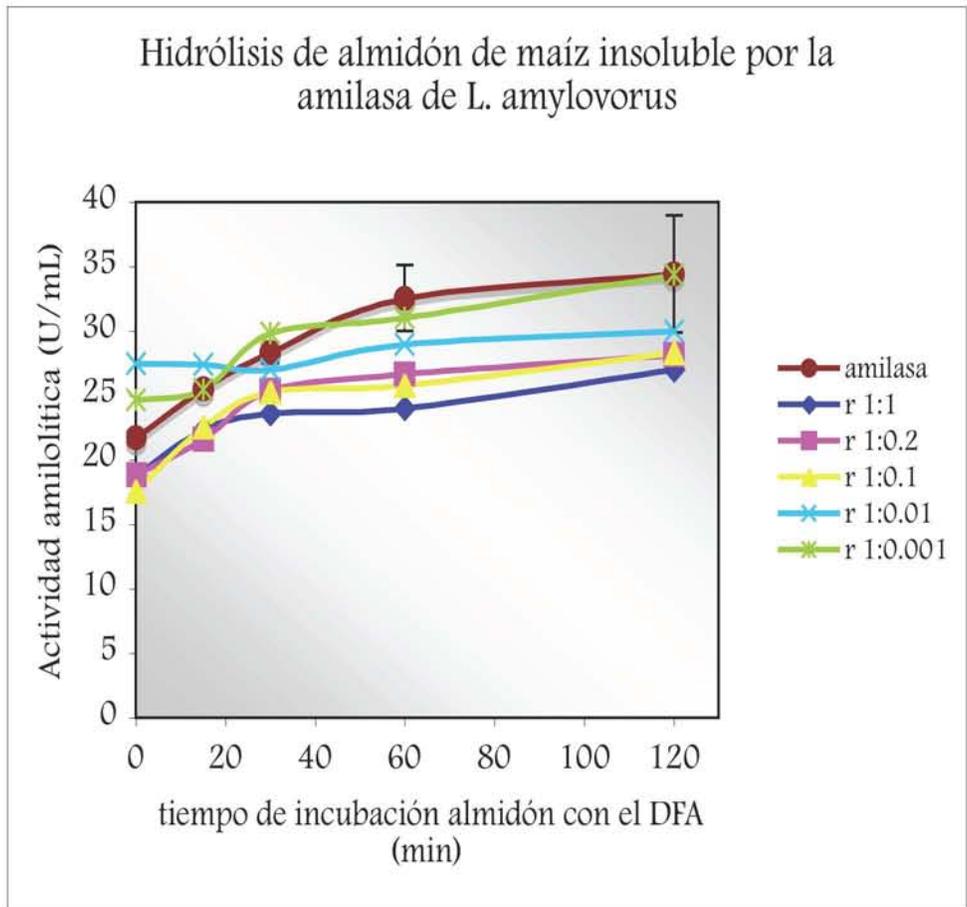


Fig. 17 Gráficos de actividad a las diferentes relaciones molares a cada uno de los tiempos de incubación manejados entre el almidón insoluble y el DFA, con la adición final de la amilasa de *L. amylovorus*.

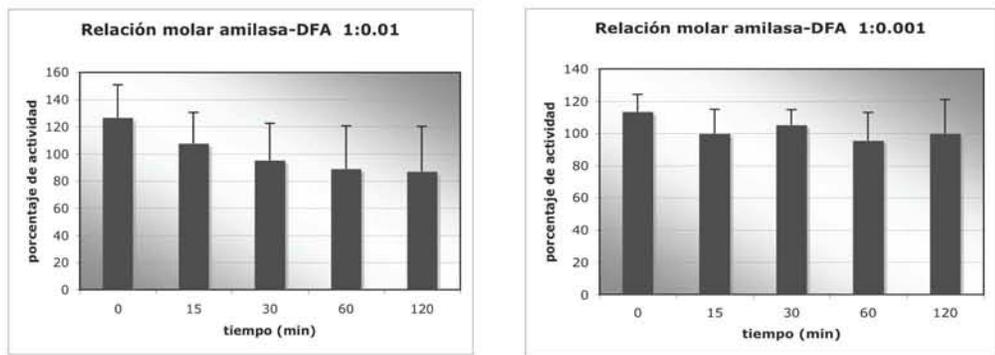


Fig. 18 Gráficas del porcentaje de actividad de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* a las relaciones molares amilasa-DFA 1:0.01 y 1:0.001, en donde se observa una aumento del 20% de actividad en los tiempos 0 y 15 min de incubación sustrato-dominio. El valor del cien por ciento fue considerado como la actividad de la amilasa sin ningún tratamiento del almidón.

Dado que el DFA se adsorbe fuertemente al gránulo, se desarrollaron los ensayos equivalentes con un módulo de fijación para investigar si hay una consecuencia en la actividad hidrolítica que pueda ser diferente a la reportada para el DFA. La Fig. 19 muestra la gráfica de actividad de los ensayos con 1 módulo de fijación y la amilasa de *L. amylovorus*.

Las actividades obtenidas en los ensayos con un módulo de fijación muestran una disminución de la actividad amilolítica, para determinar si el cambio era significativo los datos fueron sometidos al análisis estadístico de ANOVA.

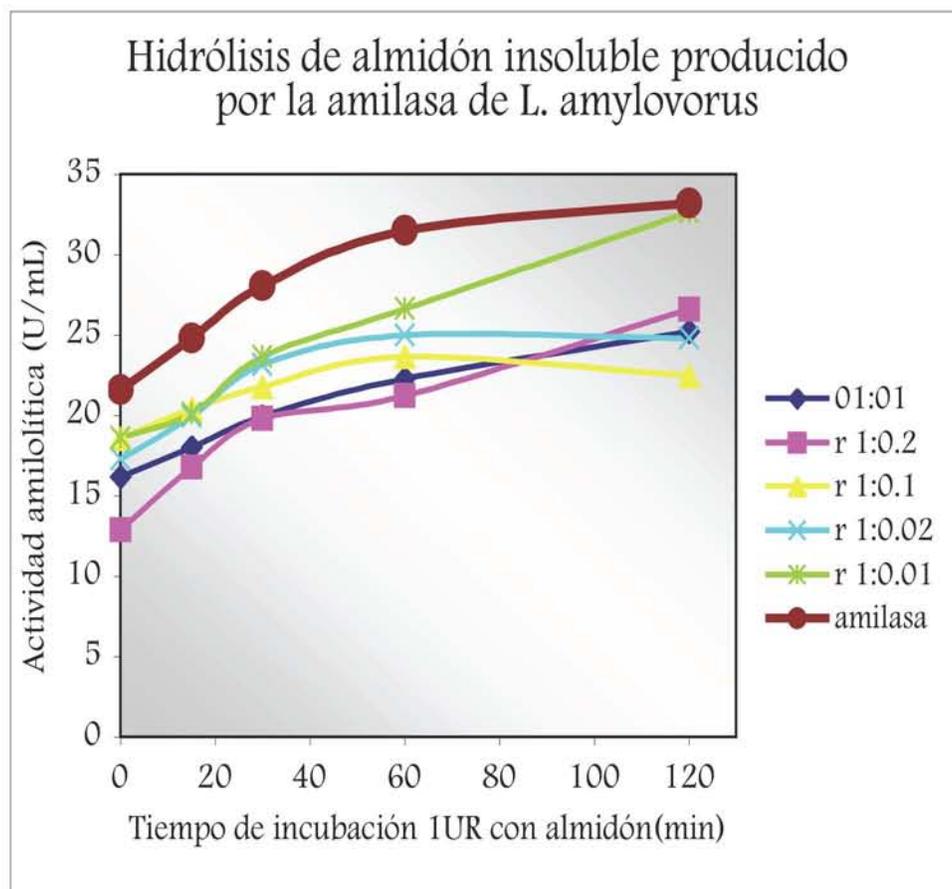


Fig. 19 Actividad amilolítica encontrada después de preincubar el almidón de maíz con un módulo de fijación.

○ Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA con dos factores a un nivel de $\alpha=0.05$ y 0.01 . El primer factor a evaluar es el de relaciones molares y el siguiente es el tiempo de incubación, las tablas 5 y 6 muestran los resultados del análisis para 1 UR y el DFA respectivamente.

Tabla 5 ANOVA con dos factores para 1UR: relaciones molares (RM), F tablas 0.05, 5, 30; tiempo de incubación (t inc), F tablas 0.05, 4, 30.

Fuente de variación	g.l.	SC	MC	Fo	F tablas	
					0.05	0.01
Tratamientos	29	1333.39	45.97			
Factor RM (A)	5	471.17	94.23	3.11	2.53	3.7
Factor t inc (B)	4	748.57	187.14	6.17	2.69	4.02
Interacción (AB)	20	113.63	5.68	0.18	1.93	2.55
Error	30	909.31	30.30			
Total	59	2242.41				

Decisión estadística:

$F_o > F_{tablas} =$ existe diferencia significativa

$6.17 > 2.69$ y 4.02 , existe diferencia entre los tiempos de incubación a los dos niveles

$3.11 > 2.53$ existe diferencia significativa entre las relaciones molares a 0.05 pero no a 0.01

$0.18 < 1.93$ y 2.55 , no hay interacción entre los factores.

Tabla 6 Análisis de varianza de dos factores para el DFA: relaciones molares (RM), F tablas 0.05, 5, 30; tiempo de incubación (t inc), F tablas 0.05, 4, 30.

Fuente de variación	g.l.	SC	MC	Fo	F tablas	
					0.05	0.01
Tratamientos	29	2070.08	71.38			
Factor RM (A)	5	719.70	143.94	4.521	2.53	3.7

Factor t inc (B)	4	1139.66	284.91	8.949	2.69	4.02
Interacción (AB)	20	210.71	143.27	4.5	1.93	2.55
Error	90	2865.45	31.83			
Total	119	4935.53				

Decisión estadística:

$F_o > F_{tablas}$ = existe diferencia significativa

$8.949 > 2.69$ y 4.02 , existe diferencia entre los tiempos de incubación a los dos niveles usados

$4.521 > 2.53$ y 3.7 existe diferencia significativa entre las relaciones molares

$4.5 > 1.93$ y 2.55 , hay interacción entre los factores con los niveles de significancia.

El hecho de que exista diferencia entre los tiempos de incubación es claro puesto que la amilasa sigue hidrolizando en cualquier condición pero como hubo diferencia entre las relaciones molares, se realizó un análisis de comparaciones múltiples aplicando para esto el método de Dunnett en el cual se compara un control con cada una de las relaciones molares. Los resultados de esas comparaciones son mostrados en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Valor absoluto de diferencias entre el control y las muestras del DFA a las diversas relaciones molares. El valor de la diferencia crítica es 8.4 para una $\alpha=0.05$ y 10.39 con un nivel de 0.01, los datos con un cambio significativo están en negritas.

Tiempo de incubación (min)	Relaciones molares				
	1:1	1:0.2	1:0.1	1:0.01	1:0.001
0	2.85	2.86	4.1	5.77	2.92
15	3.16	1.87	2.88	1.93	0.02
30	4.69	2.93	3.07	1.33	1.46
60	8.52	3.84	6.76	3.57	1.49
120	7.39	6.26	6.11	4.42	0.07

Tabla 8. Datos de valores absolutos de la diferencia del control y las muestras de 1 UR. Las diferencias críticas son de 8.43 y 10.58, con $\alpha=0.05$ y 0.01 respectivamente; los resultados resaltados en negritas muestran los cambios significativos.

Tiempo de incubación (min)	Relaciones molares				
	1:1	1:0.2	1:0.1	1:0.02	1:0.01
0	5.37	8.7	2.99	4.28	2.94
15	6.78	8.0	4.37	4.87	4.67
30	8.12	8.25	6.3	4.88	4.4
60	9.21	10.28	7.83	6.52	4.88
120	7.95	6.57	10.74	8.38	0.53

Los datos obtenidos de los análisis se pueden interpretar como que hay una disminución de la actividad amilolítica y la diferencia significativa es ocasionada por las relaciones molares que presentaban menos del 70% de la actividad total, por lo que se pensaría en un efecto de inhibición. El caso de un módulo de fijación es similar pues se tiene diferencia negativas en todas las relaciones molares, esto es se presenta disminución de la actividad amilolítica cuando el almidón de maíz es incubado con una UR por lo tanto se especularía que existiera competencia por los sitios de unión, además hay que considerar la variabilidad presentada por el sistema.

Las gráficas de la Fig. 20 indica cuales son las relaciones molares y los tiempos de incubación en que el dominio completo y un módulo de fijación tuvieron un cambio, como es evidente la gran variabilidad entre los datos no permite asegurar un efecto en la pre-incubación.

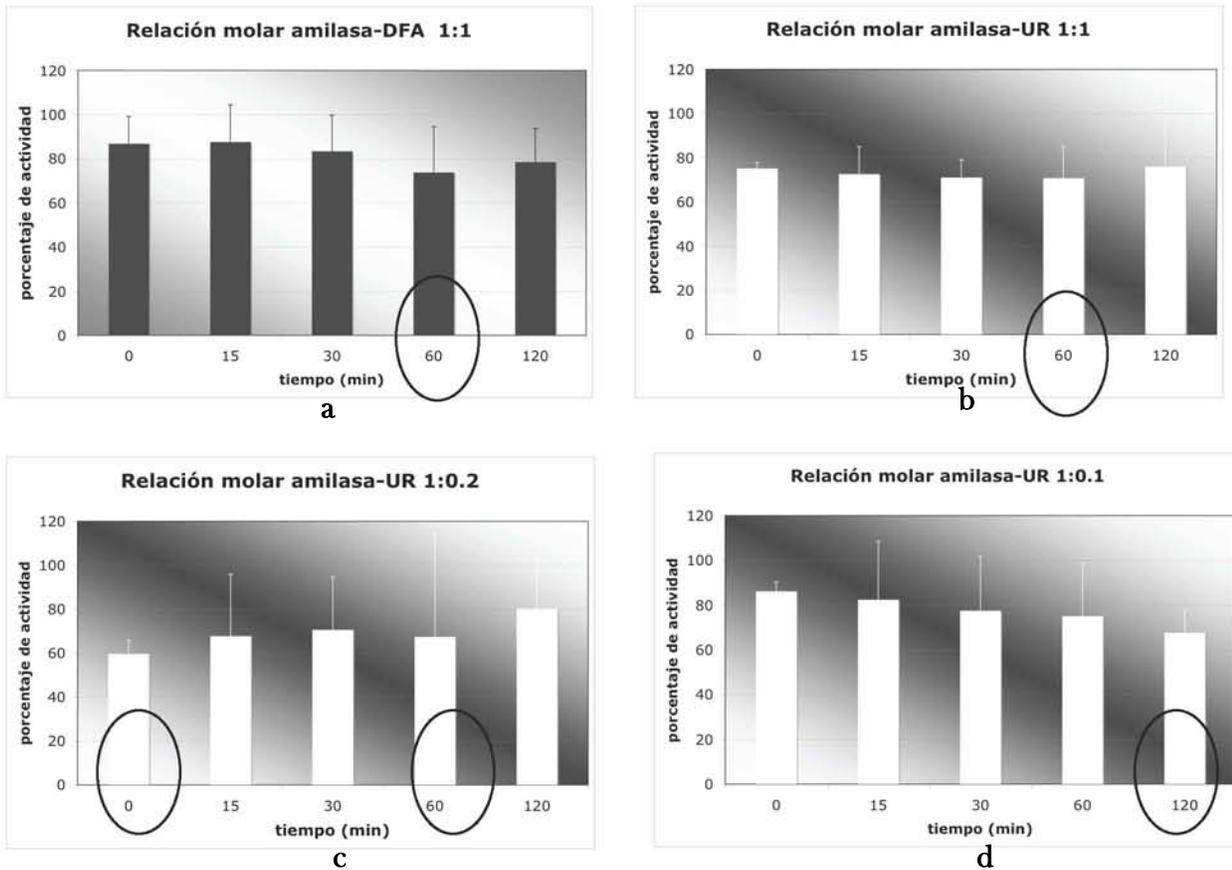


Fig. 20 Gráficas de las relaciones molares que presentaron diferencias significativas en los porcentajes de actividad amilolítica al realizar ensayos con: a) relación 1:1 amilasa-DFA; b) relación 1:1 amilasa-1UR c) relación 1:0.2 amilasa-1UR y d) relación 1:0.1 amilasa-1UR. Los tiempos que fueron diferentes son los que están en círculos.

- Ensayos con la amilasa de *Aspergillus oryzae*: hidrólisis de almidón insoluble e impacto de la adición del DFA sobre la hidrólisis.

Al no tenerse resultados concluyentes se trató de identificar si se presentaba algún efecto con la preincubación pero utilizando la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, que no es capaz de digerir el almidón insoluble.

Se realizó un ensayo para cuantificar la actividad amilolítica en sustrato soluble y poder entonces ajustar la actividad enzimática a los mismos valores usados con la enzima de *L. amylovorus*. Se usaron dos concentraciones de proteína 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la Fig. 21 se muestra la liberación de azúcares reductores generada de la hidrólisis causada por la amilasa de ese microorganismo. Se eligió la concentración más alta (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para generar las 20 U de actividad catalítica.

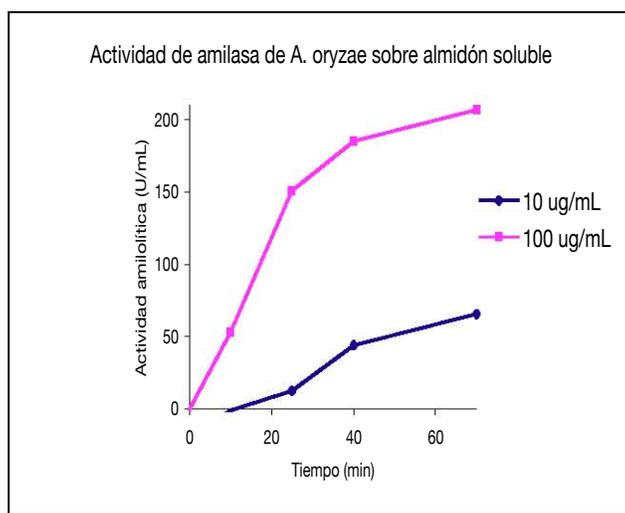


Fig. 21 Hidrólisis de almidón soluble presentada por la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* al usar 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 0, 10, 25, 40 y 70 minutos de incubación.

Esta enzima carece de un dominio de fijación al almidón, lo cual se debe reflejar en una nula hidrólisis del sustrato insoluble. Partiendo del enunciado anterior se sugirió que la adición in trans del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* podría lograr algún cambio en el almidón de manera tal que la amilasa de *A. oryzae* consiguiera degradar al almidón de maíz.

Los ensayos propuestos para trabajar en la hidrólisis de almidón insoluble establecieron la utilización de tiempos similares a los usados con los ensayos de la amilasa de *L. amylovorus*, es decir, 0, 15, 30 y 60 min de incubación almidón-DFA

con 10 min extras para medir la actividad de la enzima. En cuanto a las relaciones molares se probó con 1:1, 1:0.1, 1:0.01, 1:0.001.

Lo inicial fue verificar la incapacidad de la enzima para hidrolizar el almidón insoluble, en la Fig. 22 se muestra que no hay un aumento en la producción de azúcares reductores, de hecho ni siquiera hay un valor de absorbancia que pueda ser considerado para hacer cálculos de actividad.

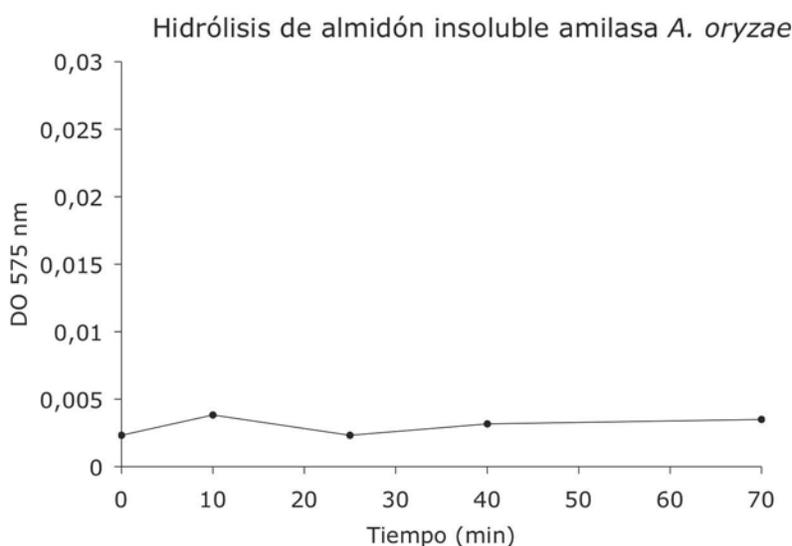


Fig. 22 Prueba de hidrólisis de almidón insoluble utilizando la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*. El ensayo se realizó cuantificando la liberación de azúcares reductores por el método de DNS

Cuando se realizaron los ensayos de mezclas de DFA con el almidón insoluble en los tiempos de incubación establecidos se observa que no hay una variación en la forma en que se hidroliza al sustrato, la Fig. 23 muestra la gráfica a los distintos tiempos y relaciones molares amilasa-DFA utilizadas.

Resultados semejantes fueron obtenidos cuando se trabajó con un módulo de fijación en donde se observa que la manera de llevar a cabo la hidrólisis del almidón insoluble no cambia sustancialmente (Fig. 24).

Esto muestra que la adición del DFA o 1 UR no provoca una mejora en la actividad amilolítica utilizando sustrato insoluble. Por tanto, se sugiere que tal vez el dominio de fijación no afecta de ninguna manera al gránulo de almidón.

Hidrólisis almidón insoluble incubado con DFA

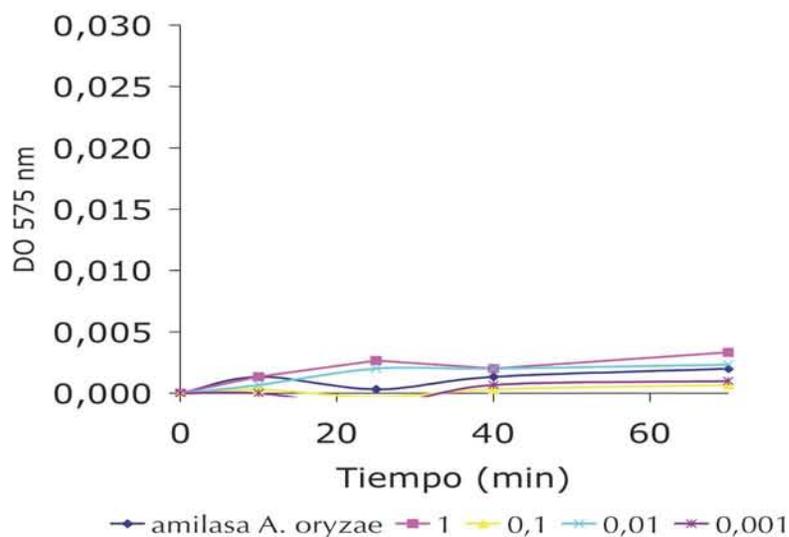


Fig. 23 Ensayo de hidrólisis de almidón insoluble con relaciones molares DFA-amilasa convenidas y los tiempos de incubación almidón-DFA 0, 10, 15, 30 y 60 min.

Hidrólisis almidón insoluble incubado con 1 módulo de fijación

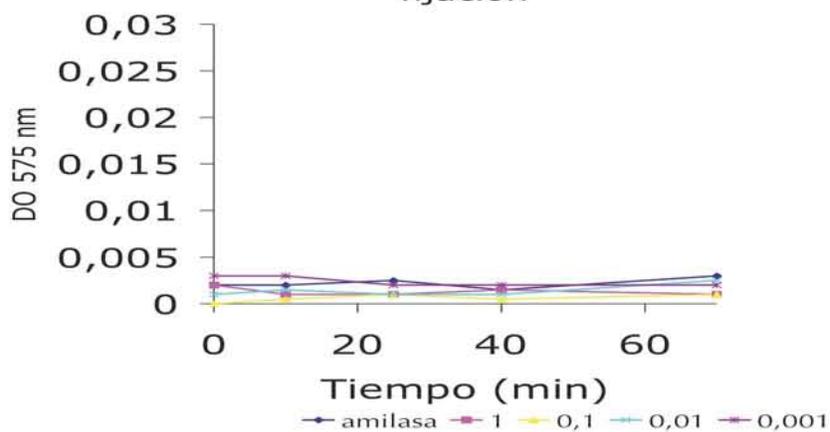


Fig. 24 Ensayo de hidrólisis de almidón insoluble con relaciones molares 1 UR-amilasa convenidas y los tiempos de incubación almidón-1 UR acordados.

Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición del dominio de fijación al almidón de la amilasa de *L. amylovorus* sobre la actividad hidrolítica de almidón insoluble.

La idea de fondo en utilizar el DFA de la α -amilasa fue dilucidar a partir de ensayos bioquímicos si es que este módulo de unión a carbohidrato puede tener un papel desorganizando o tal vez exponiendo las cadenas de amilosa del gránulo de almidón, lo que debería facilitar la hidrólisis de éste. Para ello, se realizó una incubación del sustrato con el dominio de fijación, variando la cantidad molar de este último y exponiendo la mezcla a diferentes tiempos de reacción.

Al poner en contacto esos dos componentes pudimos examinar el hecho de que la actividad hidrolítica de la enzima de *L. amylovorus* en general disminuyó (Fig. 17), en sentido riguroso ese fenómeno era de esperarse, puesto que la forma de llegar a los sitios de unión del sustrato de la enzima completa es el mismo que el del DFA aislado. Aún así podía ocurrir que el DFA estuviera de alguna manera facilitando la hidrólisis del almidón, pues se observó que a los dos tiempos iniciales de incubación se presentaba un aumento de alrededor del 20% en la actividad amilolítica de la amilasa (Fig. 18).

Por otra parte, se decidió utilizar un módulo de fijación porque al tener un tamaño menor y una forma de adsorberse al gránulo más débil podría causar un efecto diferente al presentado por el DFA. Sin embargo, lo que se obtuvo en general fue un decremento en la actividad hidrolítica (Fig. 19).

Al llevar a cabo la evaluación estadística para decidir si el aumento encontrado con el DFA en los tiempos 0 y 15 min de incubación era significativo, se optó por utilizar

dos niveles de alfa 0.05 y 0.01 % para poder descartar en un sentido amplio el efecto producido. Lo obtenido muestra que ese aumento no es un cambio que deba considerarse como importante, pero si lo es el decremento visto en las relaciones molares 1:1 amilasa-DFA/1UR y las 1:0.2, 1:0.1 del amilasa-1UR (Fig. 20) que se presenta a los 60- 120 min de incubación. Este hecho puede ser justificado en el sentido que a mayor tiempo de contacto almidón-dominio este último se va adsorbiendo cada vez más obstruyendo la fijación de la enzima, condición que además ya se había establecido como indispensable para la hidrólisis [35].

Lo siguiente a identificar fue si el ligero aumento observado en la hidrólisis del gránulo preincubado con el DFA, era realmente del tratamiento para lo cual se realizó el mismo experimento pero la actividad se cuantificó con una enzima incapaz de degradar el almidón insoluble, esto es, con la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*.

Los resultados mostraron que la enzima de *A. oryzae* era incapaz de hidrolizar al almidón insoluble y que la preincubación con el DFA no generó las condiciones para que la enzima pudiera utilizar ese sustrato (Fig. 23). También se probó la acción de un módulo de fijación y se observó el mismo comportamiento obtenido con el DFA (Fig. 24). Es conveniente mencionar que las lecturas en el espectrofotómetro eran muy cercanas al cero y por tanto no se realizó la cuantificación en actividad ya que solo se estaría generando un error al sobrestimar los datos.

Trabajos relacionados con la capacidad de los módulos de unión a carbohidratos de generar una desorganización en el sustrato insoluble que faciliten la hidrólisis han sido muy controversiales. Por ejemplo, sea establecido que el DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* promueve la desestabilización en el almidón insoluble al preincubar el DFA con los gránulos. En esta prueba se midió la liberación de azúcares reductores producidos por el dominio catalítico de la enzima [52]. Estudios estructurales anteriores mostraron que el DFA de la glucoamilasa tiene

dos sitios de unión que interaccionan con el carbohidrato modificando la orientación de las cadenas que pasan de paralelas a perpendiculares, dicho cambio en el almidón sería el que facilitaría la hidrólisis. Sin embargo, en otros DFA como el de la β -amilasa de *Bacillus cereus* no se ha encontrado la topología necesaria para establecer los dos sitios de unión requeridos para deformar las cadenas superficiales del gránulo.

Si bien la identidad entre los diferentes DFAs es muy reducida, del orden del 15%, se decidió realizar un alineamiento del dominio de fijación de la glucoamilasa y el de la α -amilasa con el objetivo de tratar de identificar los sitios de unión descritos (Fig. 25). Se encontraron uno de los triptófanos del sitio 1, y las dos tirosinas del sitio de unión 2, pero ningún sitio completo. Por ello, es probable que la interacción que presenta el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* no sea como la descrita para el DFA de la glucoamilasa de *A. niger*.

2
1
2
2
1
1
1

```

GluAni ATTYGENIYLVGSI SQLG-DWETSDGIAL SADKYTSSDPLWYVT VTLPAGESFEYK-FI RIESDDSVEWESDPN
AmyLam GSRVYAYVYNKNTN- KAITSAWPGKKMTAL GNDKYELDLDTDEDD SDLAVIFDGTK--- QTPAANEAGFTFTAD
  
```

Fig. 25 Alineamiento de los Dominios de Fijación al Almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (GluAni) y la amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (AmyLam). Los aminoácidos resaltados en negro son los que se encuentran en el sitio 2 (número por arriba de los símbolos) y los marcados en gris son los presentes en sitio 1.

En el sistema de celulosa se encuentra la misma polémica. Se ha reportado que el DUC de la celulasa de *C. fimi*, aumenta la liberación de fragmentos de celulosa mejorando la capacidad de la enzima para hidrolizar al sustrato [46]. Por otro lado, al intentar probar esa habilidad con el DUC de la xilanasas de *P. fluorescens* subsp *cellulosa* no se pudo encontrar que hubiese un cambio significativo en la hidrólisis [48].

Es probable que, la diferencia entre los resultados obtenidos en los diferentes ensayos sea la manera de llevarlos a cabo, pues al trabajar con sistemas insolubles hay

factores importantes a considerar como la homogeneidad de la muestra y claro está, el tratamiento estadístico aplicado. Pues es de llamar la atención que los DUC no tengan dos sitios de unión y aún así se haya visto un cambio en la forma de hidrolizar y es más sorprendente que los dominios de unión a celulosa tomados como ejemplo pertenezcan a una sola familia por lo que tienen los mismos aminoácidos implicados en la unión al polisacárido.

Bajo las condiciones experimentales usadas no se encontró ningún efecto significativo de la preincubación con el DFA, sin embargo, los resultados encontrados especialmente al incubar con bajas concentraciones del dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* son indicativos que este dominio podría participar en la preparación del sustrato para la catálisis, es importante realizar estudios estructurales que nos permitan una apreciación más cercana del fenómeno.

Conclusión

- ◆ El dominio de fijación al almidón y un módulo preincubados con el sustrato no ejercen un efecto en la actividad hidrolítica cuando se usa la amilasa completa de *Lactobacillus amylovorus*.
- ◆ Al adicionar por separado un módulo y el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* no se observó modificación en la actividad amilolítica de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en sustrato insoluble.
- ◆ Se plantea que la función del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* sea solo la de adsorberse al gránulo de almidón, puesto que no hubo un efecto positivo en la actividad amilolítica de las amilasas, que sugiriera la deorganización en la estructura del almidón causada por este módulo de unión a carbohidrato.
- ◆ Es recomendable hacer un estudio similiar usando el dominio catalítico de la α -amilasa de *L. amylovorus* para saber el efecto en un sentido de especificidad de especie del DFA cuando se agregue separado.
- ◆ La forma de encontrar resultados reproducibles y confiables es vigilando las variables involucradas en sistemas de sustratos insolubles, tales como la homogeneidad, métodos analíticos sensibles, análisis estadísticos, entre otros.

Bibliografía

1. Badui, Salvador. Química de alimentos. Alambra Mexicana, México, 1996. pg. 94-98.
2. Smith, A. M., K. Denyer, C. Martin. 1997. The synthesis of starch granule. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 67-87
3. Smith, A. M. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules.* 2: 335-341
4. Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial application. *Current Opinion in Plant Biology.* 7:210-218.
5. Tester, R. F., J. Karkalas y X. Qi. 2004. Starch structure and digestibility Enzyme – Substrate relationship. *World's Poultry Science Association.* 60:186-195.
6. Lehninger, Albert. Bioquímica. Ediciones Omega, España, 1995.
7. Serna Saldivar, Sergio R Othón. Química, almacenamiento e industrialización de cereales. AGT Editor S. A., México, 2001. pg. 52.
8. Piotr M.W., Koziol A., Noworyta A. 2001. Iteration model of starch hydrolysis by amylolytic enzymes. *Biotech and Bioenginn* 5: 530-539.
9. www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/polymer/RMP/nitin/Starchstructure.html
10. Gallat, D. J., Brigitte Bouchet and Paul M. Baldwin. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers* 32:177-191
11. Crochet, Perrine, Thierry Beauxis-Lagrave, Timothy R. Noel, Roger Parker y Stephen G. Ring. 2004. Starch cristal solubility and starch granule gelatinisation. *Carbohydrate Research.* 1-7.
12. van der Maarel, Marc J. E. C., Bart van der Veen, Joost C. M. Uitdehaag, Hans Leemhuis, L. Dijkhuizen. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α - amylase family. *Journal of Biotechnology* 94: 137-155.
13. Bourne Yves, Bernard Henrissat. 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and funtional modules. *Current Opinion in Structural Biology.* 11:593-600.
14. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/db.html>
15. Davies Gideon, Bernard Henrissat. 1995. Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.

16. Simpsom P. J., David N Bolam, Alan Cooper, Antonio Ciruela, Geoffrey P Hazlewood, Haru J Gilbert y Michael P Williamson. 1999. A family IIb xylan-binding domain has a similar secondary structure to a homologous family IIa cellulose-binding domain but different ligand specificity. *Structure* 7:853-864.
17. MacGregor E. Ann, Stefan Janecek, Birte Svensson. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α - amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1546: 1- 20.
18. Warren R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysacharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:183-212.
19. Svensson B, Tovborg M, Mori H, Bak- Jensen KS, Bonsager B, Nielsen PK, Kramhoft B, Praetorius.Ibba M, Nohr J, Juge N, Greffe L, Williamson G, Driguez H. 2002. Fascinating facets of funtion and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biologia* 57 suppl 11: 5-19
20. Da Lage, J.-L., G. Feller, S. Jenecek. 2004. Horizontal gene transfer from Eukarya to Bacteria and domain shuffling: the α - amylase model. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 97-104
21. Janecek Stefan. 1993. Sequence similarities in $(\alpha/\beta)_8$ - barrel enzymes revealed by conserved regions of α - amylase. *FEBS* 1: 23-26
22. Dalmia, B. K., Kai Shütte and Zivko L. Nikolov. 1995. Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: an independent starch-binding domain. *47(5):575-584.*
23. Uitdehaag JCM., van der Veen BA, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2002. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypal transglycosylase from the α - amylase family. *Enzymes and microbial technology* 30: 295 – 304.
24. Svensson, B. 1988. Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglycanosylases. *FEBS Lett* 230: 72 – 76
25. Matsuura Yoshiki. 2002. A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of α - amylase family. *Biología* 57 Suppl. 11: 21-27.
26. Janecek, S. 1997. α -amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys Molec. Biol.* 67(1):67-97.
27. Janecek, S. 2002. How many conserved sequence regions are there in the α -amylase family? *Biologia, Bratislava.* 11: 29-41.

28. Davies G.J., Wilson K.S. and Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar- binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 321: 557- 559.
29. McCarter J. D and S. G. Whiter. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology.* 4: 885- 892.
30. Jamal S., Nurizzo D., Boraston A. B. and Davies G. 2004. X- ray Crystal structure of a non- crystalline cellulose- specific carbohydrate- binding module: CBM28. *J. Mol. Biol.* 339: 253- 258.
31. Carrad G., Koivula A., Söderlund H. and Béguin P. 2000. Cellulose- binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *PNAS* 19: 10342- 10347.
32. Levy Ilan, Paldi T., Shoseyov O. 2004. Engineering a bifunctional starch-cellulose cross-bridge protein. *Biomaterials* 25:1841-1849.
33. Simpson P.J., Xie H., Bolam D.N., Gilbert H. J., Williamson M.P. 2000. The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate binding modules. *J. Biol. Chem.* 275: 41137-42
34. Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R. and Shoham Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current opinion in structural biology* 8: 548- 557.
35. Rodríguez-Sanoja R., Ruiz B., Sánchez S. 2005. Starch Binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus* α -amylases. *Applied and Environmental Microbiology* 297- 302.
36. Janecek Stefan. 2002. A motif of a microbial starch- binding domain found in human genethonin. *Bioinformatics* 11: 1534- 1537.
37. Ashikari T, Nakumura N, Tanaka Y, Kiuchi N, ShiBano Y, Tanaka T, Amachi T, Yoshizumi H. 1986. *Rhizopus* raw-starch degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agri. Biol. Chem.* 50: 957-964.
38. Bui DM, Kunze I, Förster S, Wartmann T, Horstmann C, Manteufel R, Kunza G. 1996. Cloning and expression of an *Arxula adenivoras* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 610-619.
39. Abe A. Tonzuka T, Sakano Y, Kamitori S. 2004. Complex structure of *Thermonactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch- binding domain. *J. Mol. Biol.* 335: 811-822.
40. Janecek S., Sevcík J. 1999. The evolution of starch- binding domain. *FEBS letters* 456: 119- 125.

41. Rodríguez-Sanoja R., Oviedo N., Sánchez S. 2005. Microbial starch- binding domain. *Current opinion in microbiology* 8:1- 10
42. Iefuki H., Chino M., Kato M. and Iimura Y. 1996. Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem. J.* 318:989-996.
43. Sauer J., Sigurskjold BW., Christensen U., Franden TP., Mirgorodskaya E., Harrison M., Rorpstorff P., Svensson B. 2000. Glucoamylase: structure/ function relationships, and protein engineering. *BBA* 1543: 275 – 293.
44. Reese E.T., Sui R.G.H., Levinson H.S. 1950. Biological degradation of soluble cellulose derivates. *J Bacteriol.* 59: 479- 485.
45. Levy I., Shan Z., Shoseyov O. 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo- 1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering* 19: 17-30.
46. Din N., Gilkes N.R., Tekant B., Miller Jr R.C., Warren A.J. and Kilburn D.G. 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Biotechnology* 9: 1096- 1099.
47. Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller Jr R.C., Warren A.J. and Kilburn D.G. 1994. C₁- C_x revisited: Intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11383- 11387.
48. Bolam D.N., Ciruela A., McQueen-Mason S., Simpson P.J., Williamson M.P., Rixon J.E., Boraston A., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J.* 331: 775- 781.
49. Gill J., Rixon J.E., Bolam D.N., McQueen-Mason S., Simpson P.J., Williamson M.P., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. 1999. The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas* xylanase A potentiate catalytic activity against complex substrate by a common mechanism. *Biochem J.* 342: 473- 480.
50. Nagy T., Simpson P., Williamson M.P., Hazlewood G.P., Gilbert H.J., Orosz L. 1998. All three surface tryptophans in type IIa cellulose binding domain play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS letters* 429: 312- 316.
51. Din N., Forsythe I.J., Burtnick L.D., Gilkes N.R., Warren R.A.J. and Kilburn D.G. 1994. The cellulose- binding domain of endoglucanase A (CenA) from *Cellulomonas*

- fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Molecular Microbiology* 4: 747- 755.
52. Southall S., Simpson P. J., Gilbert H.J., Williamson G., Williamson M. P. 1999. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Letters* 447:58-60.
53. Sourimachi 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 glycoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 259: 970 – 987.
54. Juge N. Le Gal-Coëffet M-F, Furniss CSM, Gunning AP, Kramhoft B, Morris VJ, 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. *Biologia* 57 Suppl 11: 239-245.
55. Sorimachi K., M-F Le Gal-Coëffet, G. Williamson, D. B. Archer and M. P. Williamson. 1997. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β - cyclodextrin. *Structure* 5: 647 – 661.
56. Giardiana Thierry, A. Patrick, Gunning, N. Juge, C. B. Faulds, C. S. M. Furniss, B. Svensson, V. J. Morris and G. Williamson. 2001. Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose. *J. Mol. Biol.* 313:1149-11459.
57. Crabb, W. D. and Jay K Shetty. 1999. Commodity scale production of sugars from starches. *Current Opinion in Microbiology.* 2:252-258
58. Pandey, A., Poonam Nigam, Carlos R. Soccol, Vanete T. Soccol, Dalel Singh and Radjiskumar Mohan. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotech Appl Biochem.* 31:135-152.
59. Dellaglio, F., de Roisart, H., Torriani, S., Curk, M. C. et Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Roissart, H. et Luquet, F. M. (Cordonateurs) Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume I. Loriga. France.
60. Desmazeud, M. J. et Roisart, H. (1994). Metabolisme general des bactéries lactiques. In: Roissart, H. et Luquet, F. M. (Cordonateurs) Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume I. Loriga. France.

61. Giraud E, Braum A, Keleke S, Lelong B and Raimbault. 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl Microbiol Biotechnol 36: 379-383.
62. Nakamura LK and Crowell CD. 1979. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolysing species from swine waste-corn fermentation. Dev Ind Microbiol 20: 535-540.
63. Nakamura LK. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolysing species from cattle waste corn fermentation. Int J Syst Bacteriol 31: 56-63.
64. Agati V, Morlon-Guyot JP, Talamond P, Hounhouigan DJ. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strain of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. Journal of Applied Microbiology 85: 512-520.
65. Sen S and Chakrabarty SL. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable waste. J Ferment Technol 5: 407-413.
66. Morlon-Guyot J, Guyot JP, Pot B, Jacobe de Haunt and Raimbault RM. 1998. *Lactobacillus manhitovorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. Int J Syst Bacteriol 48: 1101-1109.
67. Bohak I, Back W, Richter L, Eirman M, Ludwing W and Scheleifer KH. 1998. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. Syst Appl Microbiol 21: 360-364.
68. Morlon-Guyot J, Mucciolo-Roux F, Rodríguez-Sanoja R and Guyot JP. 2001. Characterization of the *Lactobacillus manhitovorans* α -amylase gene. DNA Seq 12: 27-37.
69. Jore JP and De Parasis J. 1993. Studies on the α -amylase of *Lactobacillus amylovorus* as a model for heterologous protein secretion by lactobacili. FEMS Microbiol Rev 12:26.
70. Giraud E and 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 structure evolutionary origin. Gene 198: 149-157.
71. Sumitani J., Tadashi Tottori, Takashi Kawaguchi and Moto Arai. 2000. New type of starch-binding domain: the direct 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.

72. Boraston A. B., Michael Healey, Jonathan Klassen, Elizabeth Ficko-Blean, Alicia Lammerts van Bueren y Vivian Law. 2006. A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *J. Biol Chem.* 281(1):583-598
73. Rodríguez Sanoja, R, J. Morlon-Guyot, J. Jore, J. Pintado, N. Jude 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. *Applied and Environmental Microbiology* 3350-3356.
74. Santiago, M., Linares, L., Sánchez, S. y Rodríguez-Sanoja, R. 2005. Functional characteristics of the *Lactobacillus amylovorus* α -amylase starch binding domain. *Biología Section Cellular and Molecular Biology*, 60 suppl. 15 In press.
75. Guillén, D.A. 2005. Tesis de licenciatura. "Funcionalidad de dos y tres dominios de fijación al almidón insoluble de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*". UNAM.
76. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
77. Dunnett C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American statistical association.* 50:1096-1121.
78. Pomeranz Yeshajahn. Functional properties of food components. Segunda edición. Academic Press, 1991, USA.
79. Linder Markus, Tuula T Teeri. 1997. The role and function of cellulose-binding domain. *Journal of Biotechnology.* 57:15-28.
80. Ye Zhengmao, Hideo Miyake, Maki Tatsumi, Shingenori Nishimura, Yasunori Nitta. 2004. Two additional carbohydrate-binding sites of β -amylase from *Bacillus cereus* var. *mycoides* are involved in hydrolysis and raw starch-binding. *J Biochem.* 135:355-363.

Apéndices

1) Medios de cultivos.

a. MRS más almidón

Componentes	Cantidad (g) por litro
Peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio dibásico ($C_6H_{14}N_2O_7$)	2.17
Acetato de sodio ($CH_3COONa - 3 H_2O$)	5
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 - 7H_2O$)	0.207
Sulfato de manganeso ($MnSO_4 - H_2O$)	0.056
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	2.62
Almidón soluble	20

b. LB

Componente	Cantidad (g) por litro
NaCl	10
Triptona	5
Extracto de levadura	10

2) FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

Este sistema se desarrollo para ser utilizado en un amplio rango de purificaciones en los que diversos modos de cromatográficos como intercambio iónico, filtración en gel, afinidad, etc. son empleados. La diferencia principal del FPLC con el HPLC es la capacidad de muestra a ser tratada, esto es, se pueden manejar volúmenes y presiones mayores, así como utilizar un amplio tamaño de las columnas.

a. Principios de cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa proteínas sobre la base de interacciones reversibles (electrostáticas, hidrófobas, fuerzas de van der Waals o enlaces de hidrógeno) entre una proteína (o un grupo de proteínas) y un ligando específico acoplado a una matriz cromatográfica. La forma de separar la molécula blanco de la matriz de afinidad puede ser no específica al cambiar el pH, aumentar la fuerza iónica o polaridad; o específica por competencia con el ligando. Esta técnica ofrece una alta selectividad, así como una alta resolución.

b. Preparación de columna

Columna de afinidad Sefarosa- β -ciclodextrina acoplada

Inmovilización de β -ciclodextrina

1. Suspender 4 g de sefarosa epoxi-activada 6B en 25 mL de agua destilada (1h).
2. Lavar mediante filtro el gel, con agua destilada (400 mL).
3. Lavar el gel con 25 mL de NaOH 0.1 M.
4. Transferir el gel con 25 mL de NaOH 0.1 M a un envase hermético, eliminar exceso de líquido por succión.
5. Agregar 3.178 g de β -ciclodextrina en 28 mL de NaOH 0.1 M, agitar en baño de agua a 45°C, 16 h.
6. Al finalizar la reacción eliminar líquido por succión.
7. Bloquear los grupos activos restantes, transfiriendo el gel a un tampón de etanolamina-HCl 1M pH 8, dejar toda la noche a 45°C.
8. Lavar tres veces el gel alternando pH con:
 - 100 mL tampón de acetatos pH 4, 0.1 M, NaCl 0.5 M
 - 100 mL tampón Tris-HCl pH 8 0.1 M, NaCl 0.5 M
9. Equilibrar el gel con tampón citratos-fosfatos 0.1 M pH 5

Transferir el gel a columna

c. Lavado y almacenamiento

Posterior al uso de la columna se hacen pasar los volúmenes señalados en el pasos 8 de la preparación de la columna. El gel se guarda en una solución de NaCl 1 M, que actúa como bacteriostático.

3) Cuantificación de azúcares reductores por método DNS.

Los azúcares reductores son cuantificados según el método de Miller (1959), el cual está basado en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicilato cuando la temperatura se eleva en un medio básico. El producto de la reacción es color naranja-amarillento y posee un máximo de absorbancia a 575 nm. La sensibilidad del método es de 0 a 1 g/L de azúcares reductores.

Metodología

Muestras

1. Volumen de muestra a determinar los azúcares reductores (250 μ L)
2. Volumen de reactivo DNS (250 μ L)
3. Mezclar los volúmenes anteriores en un tubo de vidrio, colocar tapas y vortexear.
4. Meter en un baño de agua la cual debe estar en ebullición y dejar allí por 10 minutos.
5. Pasado ese tiempo sacar del baño y poner los tubos en agua fría.
6. Ajustar el volumen de los tubos a 2,5 mL con agua y vortexearlos.
7. Leer en espectrofotómetro a 575 nm.

Curva estándar

La curva estándar se realiza con una solución de glucosa a concentración 1g/L

1. Se hacen diluciones agregando a cada tubo 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ L de la solución de glucosa.
2. Llevar el volumen a 500 μ L, completando con agua cada tubo; vortexear.
3. A cada dilución agregar 500 μ L de reactivo DNS, tapar tubos y vortexear.

4. Realizar los pasos del 4 al 7. El volumen final antes de leer es de 5 mL.

4) Cuantificación de proteína. Método Bradford

Este método de cuantificación de proteínas, involucra la adición de un colorante ácido, como es el azul de Coomasie, a la solución proteica. El colorante se une a los aminoácidos básicos y ácidos resultando en un cambio de la absorbancia de 465 nm (café claro) a 595 nm (azul). Se utiliza una curva patrón para determinar la cantidad de proteína que se tienen en la muestra.

Metodología de ensayo micro usando reactivo Bradford de SIGMA.

1. Preparar de 3 a 5 diluciones del estándar (albúmina sérica bovina)
2. En tubos limpios y secos poner 800 μ L de estándar o muestra según sea el caso.
3. Agregar 200 μ L de reactivo concentrado a cada tubo y vortexear.
4. Incubar la reacción por 5 min a temperatura ambiente.
5. Leer absorbancia a 595 nm.

5) Electroforesis de proteínas.

a. Fundamento electroforesis

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

SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS esta 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.

b. Geles de poliacrilamida

A. Preparación del gel:

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

B. Preparación de las muestras

1. Se colocan las muestras en tubos eppendorff, éstas se disuelven en tampón de muestra con 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 geles de acrilamida:

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

- Protocolo para soluciones de acrilamida /Bis al 30%. Relación de Laemmli para gel separador 29:1. Volumen para 2 geles.

Reactivo	Gel de Concentración 4%	Gel de separación 7.5 %	Gel de Separación 10%
Acrilamida/Bis 30%	0.667 μ L	2.5 mL	3.333 mL
Tris.HCl 0.5M, pH 6.8	1.25mL	--	--
Tris.HCl 1.5M, pH 8.8	—	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	50 μ L	100 μ L	100 μ L
Agua destilada	2.973 mL	4.78 mL	3.947 mL
Temed	10 μ L	20 μ L	20 μ L
Persulfato de amonio 10%	50 μ L	100 μ L	100 μ L
Total	5 mL	5 mL	10mL

Tampón de muestra 4x:

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

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

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

c. Tinción azul de Coomasie

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

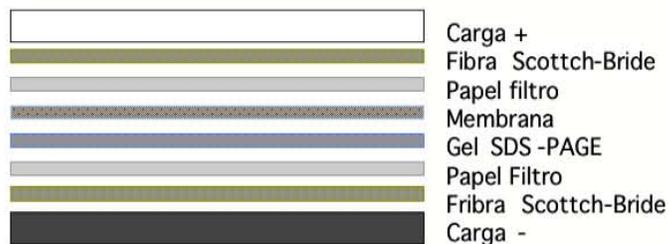
4.Desteñir II	Etanol	20 %	Inspección visual
	Ácido acético glacial	10 %	

6) Western Blot.

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

- Transferencia

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

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

5. 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.
6. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3h, 1 h a 37°C o se puede guardar durante algunos días.

- Reconocimiento con Anti-His

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

- Revelado

El revelado se realizó utilizando la actividad de fosfatasa alcalina, que se encuentra acomplejada al segundo anticuerpo.

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

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

7) Columnas de sefarosa niquelada.

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 esta cualidad es la que se utiliza para purificar proteínas con tallo de histidinas.

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

- Preparación de la columna sefarosa niquelada
1. Se agita el contenedor de la sefarosa para resuspender el gel, se toman 250µL 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 2.3rpm por 3 min. y se retira el sobrenadante.
 3. Se adiciona 1/2 volumen de NiSO_4 0.1M agitando por 5min, se centrifuga 2.3 rpm por 3 min, y se retira el sobrenadante.
 4. Se agregan 5 volúmenes de agua destilada y se agita 5 min, se centrifuga a 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 50mL de células inducidas se resuspende en 300µL de solución I (5 µL de cóctel de inhibidor de proteasas SIGMA p-2717 de uso general y 995 µL de tampón de fosfatos 20mM de Na₂HPO₄, 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 centrifugar 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 µL de sol. I, el cual se somete nuevamente a sonicación de 3 pulsos 20"/1min. de reposo.
3. Se mezcla el sobrenadante que se recuperó con el sonificado de 2 y se añade tritón al 20%, quedando a 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 en la columna de sefrosa niquelada con agitación continua por 5 min. a temperatura ambiente.
6. Se sedimenta el gel por centrifugación a 2.3rpm 5min, el sobrenadante (proteínas no adsorbidas) se recupera y se guardan en un tubo eppendorf para analizarlo en un gel SDS-PAGE.
 - Lavados de la columna
 1. Se adicionan 5 volúmenes de tampón de fosfatos con 0.05M de imidazol y se resuspende la columna agitando 5 min, después se centrifugar a 2.3rpm por 3min
 2. Se recupera el sobrenadante y se guarda para análisis en un gel SDS-PAGE.
 3. El paso de lavado se repite 9 veces más (guardando el sobrenadante en diferentes tubos para su posterior análisis)
 - Elución de la columna
 1. Se adicionan 2 volúmenes de tampón de elución (20mM de Na₂HPO₄, 0.5M de NaCl y 0.25M de Imidazol, pH 7.4*), se agita por 5 min y se centrifuga a 2.3rpm por 3min.

2. El sobrenadante (proteína purificada) se recupera en un tubo eppendorf.

Se repite cuatro veces los dos pasos anteriores (guardando cada elusión en un tubo diferente para su análisis).

*Se ajusta el pH con ácido fosfórico.