



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio termodinámico de la
interacción carbohidrato-proteína de
la α -amilasa de *Lactobacillus
amylovorus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:
BENJAMÍN GARCÍA RAMÍREZ



México, D.F.

2014



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: MARÍA DEL PILAR GRANADA MACÍAS

VOCAL: MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS

**SECRETARIO: ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ
SANOJA**

**1er. SUPLENTE: CLAUDIA GEORGINA VALVERDE
LEGORRETA**

2° SUPLENTE: OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, INSTITUTO
DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:
ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ
SANOJA**

**SUSTENTANTE:
BENJAMÍN GARCÍA RAMÍREZ**

I. Índice

🐾 Introducción	1
🐾 Abreviaturas	2
🐾 Antecedentes	3
🐾 Almidón	3
🐾 Estructura del gránulo de almidón	5
🐾 Enzimas amilolíticas	6
▪ Secuencias conservadas	8
▪ Estructura	9
🐾 Dominio de unión a carbohidratos	11
🐾 La α -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>	13
🐾 Interacciones proteína-ligando	14
🐾 Calorimetría en los módulos de unión a carbohidratos	15
🐾 Objetivo general	18
🐾 Objetivos particulares	18
🐾 Justificación	19
🐾 Hipótesis	19
🐾 Metodología	20
🐾 Resultados y discusiones	26
🐾 Conclusiones	41
🐾 Referencias	42
🐾 Apéndices	49
🐾 I Azúcares	49
🐾 II Disoluciones y medios	50
🐾 III Métodos	53
🐾 IV Ajustes ITC	59
🐾 V Aspectos técnicos del ITC	63
🐾 VI Dicroísmo circular	69

II. Introducción

El almidón es un polisacárido de reserva energética, que se encuentra ampliamente distribuido en cereales, tubérculos y en algunas frutas. Está compuesto de una porción del 17-27% de amilosa y el resto de amilopectina. La amilosa es una molécula lineal formada por unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$. La amilopectina también tiene este tipo de enlaces, sin embargo presenta ramificaciones con enlaces $\alpha(1-6)$.

Para su uso, los seres vivos han desarrollado diferentes tipos de enzimas, conocidas genéricamente como amilasas, capaces de hidrolizar los enlaces presentes en la amilosa y la amilopectina. Sin embargo, en la naturaleza el almidón se presenta en forma de gránulos densos e insolubles que no interactúan con el agua, por lo que no pueden ser hidrolizados por cualquier amilasa.

Las amilasas que son capaces de hidrolizar los gránulos de almidón presentan en su estructura un dominio adicional que favorece su fijación al almidón (Dominio de Fijación al Almidón-DFA) o un sitio de unión al almidón en la superficie de la proteína. La función de este dominio o sitio es la de fijar la enzima en solución al sustrato insoluble permitiendo la interacción entre ellos y facilitar el acceso del sustrato al sitio catalítico.

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* contiene un DFA formado por cinco módulos idénticos en tándem. Estudios realizados sobre este sistema han demostrado que la capacidad de adsorción del DFA está en función del número de módulos presentes, es decir, que cada módulo puede unirse aislado del resto pero al presentarse en tándem actúa de manera sinérgica optimizando la unión al almidón crudo.

En este trabajo se busca profundizar el conocimiento que se tiene sobre la interacción de los módulos en tándem (DFA) de la α -amilasa de *L. amylovorus* con el almidón, para realizarlo se selecciono como ligando de prueba a la β -Ciclodextrina (β -CD), el cual es un compuesto que imita la estructura en el espacio de la amilosa pero que no es hidrolizado por la amilasa. Como técnica de estudio se seleccionó la calorimetría de titulación isotérmica, metodología que permite determinar la estequiometría de unión con el ligando además de las constantes termodinámicas que gobiernan la dicha interacción.

Abreviaturas

CBM	Carbohydrate Binding Module, en español Modulo de Unión a Carbohidratos
DFA	Dominio de Fijación al Almidón
LaDFA	Dominio de Fijación al Almidón de <i>Lactobacillus amylovorus</i>
K_a	Constante de afinidad, con unidades de M^{-1}
ΔH	Cambio en la entalpia, con unidades calorías/mol
ΔS	Cambio en la entropía, con unidades calorías/mol·K
ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs, con unidades calorías/mol
ITC	Siglas en inglés de Isothermal Titration Calorimetry, en español Calorimetría de Titulación Isotérmica
β -CD	β -Ciclodextrina
GlcSGlc ₂	S- α -D-glucopiranosil-(1→6)-(6-tio- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-D-glucopiranososa (6 ² -tiopanososa)
GlcSGlc ₃	S- α -D-glucopiranosil-(1→6)-(6-tio- α -D-glucopiranosil)-(1→4)- α -D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucopiranososa
GlcSGlc ₄	S- α -D-glucopiranosil-(1→6)-(6-tio- α -D-glucopiranosil)-(1→4)- α -D-glucopiranosil-(1→4)- α -D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucopiranososa

III. Antecedentes

Almidón

El almidón es un biopolímero que estructuralmente se encuentra como pequeños gránulos, cuyo tamaño puede variar desde 1µm hasta 100µm. [Jane, 2009]



Figura 3.1. Modelo de la estructura de la hélice de amilosa [Nelson y Cox, 2013].

Las dos cadenas de carbohidratos que componen mayoritariamente al almidón son la amilosa y la amilopectina. Ambas estructuras difieren en tamaño, longitud de la cadena, número de cadenas y peso molecular.

La amilosa es una molécula predominantemente lineal, compuesta por unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$. Tiene un grado de polimerización (DP) de 500 a 5000, con cadenas de de 4 a 100 unidades de glucosa. Su peso molecular puede encontrarse entre los 10^4-10^6 Da

[Belitz y Grosch, 1997; Gidley, 2001], es una estructura poco ramificada (<0.1%), es decir presenta pocos enlaces $\alpha(1-6)$ [Bergthaller y Hollmann, 2007].

La amilosa tiene una estructura helicoidal hacia la izquierda, y cada vuelta de la hélice está formada por seis monosacáridos (figura 3.1). En esta hélice, los grupos hidroxílicos se encuentran hacia afuera, lo cual le permite interactuar con compuestos polares y formar puentes de hidrógeno con el agua; y más importante, con otras hélices. Las hélices tienden a asociarse en paralelo con las otras hélices, y formar dobles hélices; sin embargo, la formación de las dobles hélices depende del tamaño de la amilosa, la temperatura y la concentración de las mismas. Contrariamente a su exterior polar, la hélice tiene un interior hidrofóbico que le brinda la capacidad de incorporar en su estructura ácidos grasos libres, monoglicéridos o alcoholes alifáticos. [Bergthaller y Hollmann, 2007]

En la amilopectina las glucosas se encuentran unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$. A diferencia de la amilosa, los enlaces $\alpha(1-6)$ o ramificaciones son más abundantes en la amilopectina y pueden variar entre el 5 y 6% dependiendo del origen. El peso molecular de la amilopectina se encuentra en el intervalo de 10^6 a 10^8 Da y su DP muestra un rango de 10000 a 100000 [Bergthaller y Hollmann, 2007; Gidley, 2001; Jane, 2009]. La amilopectina presenta un punto de ramificación cada 15-30 restos de glucosa, los modelos moleculares asumen que también la amilopectina forma dobles hélices ordenadas de forma paralela. [Bergthaller y Hollmann, 2007]. La organización básica de las cadenas de amilopectina fue descrita desde 1952 por Peat y colaboradores, quienes la clasificaron en tres tipos A, B y C.

Las cadenas A (DP 6-15) son cortas y sin ramificaciones. Se unen por su extremo reductor (a través del C_6 de las unidades de glucosa) a una cadena B, formando un enlace $\alpha(1-6)$. Las cadenas B son las cadenas exteriores que se encuentran ramificadas y conectadas a dos o más cadenas A o B, a su vez estas cadenas se dividen en B1 (DP 15-25), B2 (DP 40-50) y B3 (DP 50 a más) dependiendo de su longitud. Las cadenas C tienen unidas a las cadenas B y tienen el único residuo terminal de D-glucosa reductora. [Buléon, *et al.*, 1998; Bergthaller y Hollmann, 2007]

El modelo estructural aceptado para la amilopectina es el de clúster en el cual subcadenas individuales de moléculas de amilopectina se empaquetan en densas ramificaciones. La figura 3.2 ilustra que las cadenas B1 están confinadas en un clúster, mientras que las cadenas B2 abarcan dos clúster, y en consecuencia B3 abarcarían tres clúster. [Bergthaller y Hollmann, 2007]

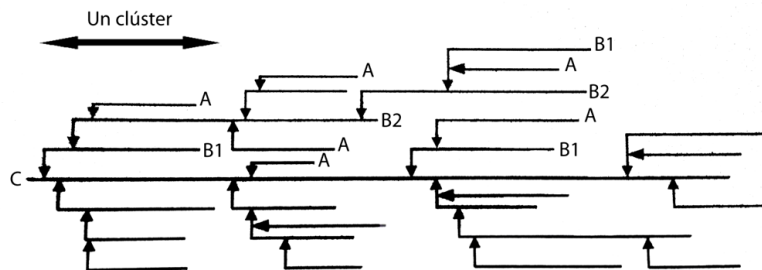
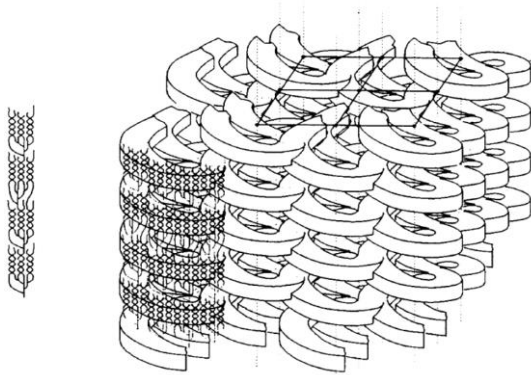


Figura.3.2. Modelo estructural de la amilopectina, ilustra los diferentes tipos de subcadenas de la molécula de la amilopectina. [Bergthaller y Hollmann, 2007]



Adicionalmente, los clúster de amilopectina pueden formar hélices llamadas superhélices que giran hacia la izquierda y tienen un diámetro exterior de 18 nm y uno interior de 10 nm. (Figura 3.3) [Oostergetel y van Bruggen, 1993]

Figura 3.3. Modelo esquemático de la superhélice de la amilopectina [Oostergetel y van Bruggen, 1993]

Estructura del gránulo de almidón

Las investigaciones de difracción de rayos X indican que el almidón está compuesto de finas laminillas cristalinas que contienen superhélices de amilopectina de aproximadamente 5-6 nm de espesor y de laminillas amorfas que contienen moléculas de amilopectina y amilosa de 2-5 nm de espesor. [Oostergetel y van Bruggen, 1989; Buléon, 1998; Bergthaller y Hollmann, 2007]

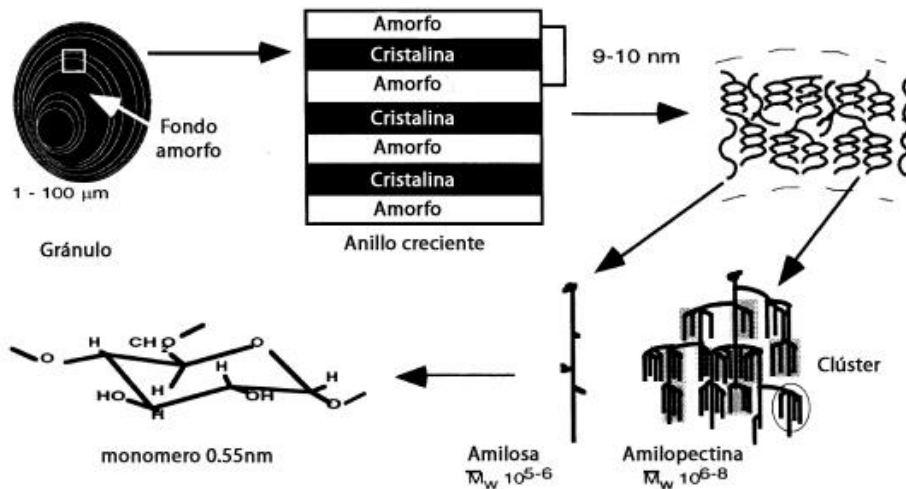


Figura 3.4. Estructura del granulo de almidón, para más detalle ver el texto. [Buléon, 1998]

Se cree que el crecimiento del gránulo de almidón se da en forma radial y gradual, además de que es acompañado por la síntesis de nuevas moléculas de amilopectina en la superficie; sin embargo, esta teoría no es completamente clara. La alternación regular de laminillas cristalinas y amorfas forma conchas cristalinas o anillos que tienen una distancia repetida de 9-10 nm, con un espesor de 100 a 400 nm. (Figura 3.4 y 3.5) [Oostergetel y van Bruggen, 1989; Bergthaller y Hollmann, 2007]

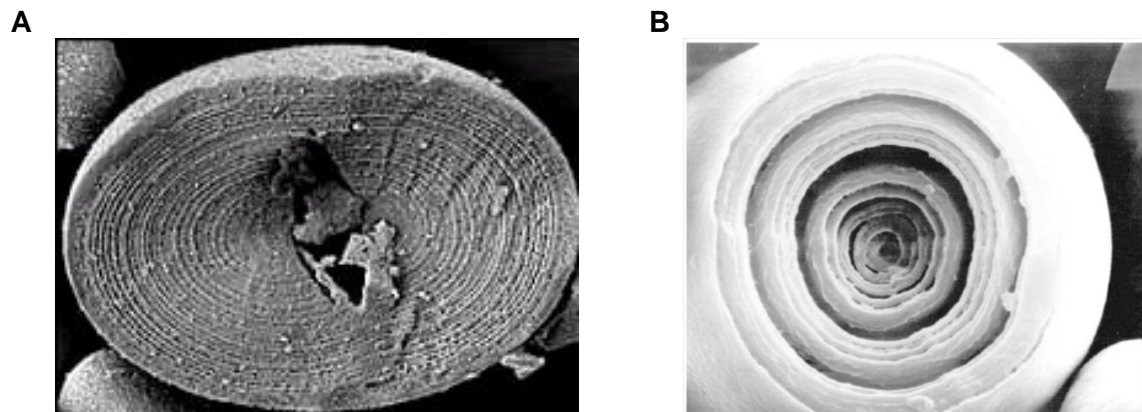


Figura 3.4. A. Micrografía de transmisión electrónica (TEM) del gránulo de almidón Imagen del gránulo de almidón que muestra las laminillas alternadas, cristalina y amorfa [Pilling y Smith 2011]. B. Micrografía de barrido electrónico (SEM) del gránulo de almidón de papa que muestra zonas cristalinas altamente ordenadas [Mukerjea, *et al.*, 2009]

Enzimas amilolíticas

Las enzimas con capacidad de degradar o transformar al almidón reciben el nombre de enzimas amilolíticas. De acuerdo con Robyt [2009] estas son:

- | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| ❖ Amilasas | Hidrólisis de enlaces | (1→4) α-D-glucosídico |
| ❖ Isoamilasas | Hidrólisis de enlaces | (1→6) α-D-glucosídico |
| ❖ Glucosiltransferasas | Transferencia de enlaces | (1→4) α-D-glucosídico |
| ❖ Transferasas | Enzimas ramificadoras | Transferasa α-(1→4) α-(1→6) |

Por su modo de acción, las amilasas se dividen en tres clases:

- ❖ Endo-amilasa, actúan hidrolizando al azar los enlaces glucosídicos α -(1→4) al interior de la molécula de amilosa liberando oligosacáridos de longitud variable.
- ❖ Exo-amilasa, actúan hidrolizando al azar los enlaces glucosídicos α -(1→4) en los extremos no reductores de las cadenas de polímeros del almidón liberando maltosa o glucosa
- ❖ Isoamilasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1→6) en las ramificaciones de la amilopectina, glucógeno y dextrinas limite.

Específicamente, las α -amilasas son enzimas que actúan como endo-amilasa, hidrolizando al azar los enlaces α -(1→4) al interior de la molécula de amilosa, liberando oligosacáridos de longitud variable.

En general la hidrólisis enzimática de los enlaces glucosídicos se caracteriza por una catálisis ácida que requiere de un protón donador y una base nucleófila. El mecanismo para ruptura de los enlaces glucosídicos mediante α -amilasas es el de retención. [Janeček, 2009].

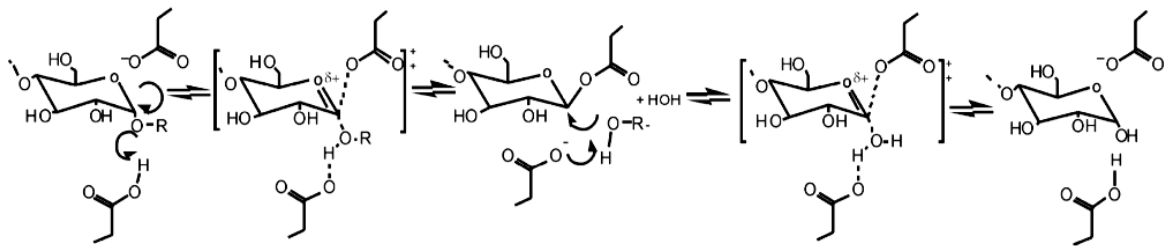


Figura 3.8. Mecanismo de retención. Ver texto para mayor detalle. [Janeček, 2009]

El mecanismo de retención es un mecanismo de doble desplazamiento (Figura 3.8), en el cual se ven involucrados tres residuos catalíticos del sitio activo, un ácido glutámico como donador de protón, un aspartato como agente nucleófilo; y

un segundo aspartato, el cual acomoda al sustrato para unirse a los grupos hidroxilo mediante puentes de hidrógeno.

El mecanismo involucra cinco pasos [van der Maarel, *et al.*, 2002].

- (i) Al unirse el sustrato al sitio activo, el ácido glutámico dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico entre los subsitios -1 y +1, mientras que el aspartato nucleofílico ataca al C1 de la glucosa en el subsitio -1.
- (ii) Se establece un estado de transición seguido por la formación de un intermediario covalentemente unido.
- (iii) El residuo de glucosa protonado en el subsitio +1 abandona el sitio activo, mientras que una molécula de agua (hidrólisis) o una nueva glucosa (transglucosilación) ataca la unión covalente entre la glucosa del subsitio -1 y el aspartato.
- (iv) Un nuevo estado de transición es formado.
- (v) El glutamato acepta un hidrógeno proveniente de la molécula de agua entrante o de la nueva glucosa en el subsitio +1 y el oxígeno perteneciente a la nueva molécula reemplaza la unión oxígeno-carbono existente entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato, formando un nuevo grupo hidroxilo en el C1 de la glucosa del subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre las glucosas de los subsitios -1 y +1 (transglucosilación)

Secuencias conservadas

La primera α -amilasa que tuvo una estructura reportada fue la Taka-amilasa y gracias a que se resolvió su estructura en complejo con la acarbosa se identificaron los tres residuos que participan en la catálisis: Asp 206, Glu 230 y Asp 297. [Matsuura, 1979, 1984].

Nakajima (1986) alineó 11 secuencias de aminoácidos de diferentes α -amilasas. Se encontraron 4 regiones homólogas que fueron numeradas como 1, 2, 3 y 4 (Figura 3.7). En esas regiones se observan muchos de los residuos importantes para la función de la enzima incluyendo la tríada catalítica, reportada previamente

por Matsuura. Estas regiones se encuentran cercanas al C terminal de las hebras β_3 , β_4 , β_5 y β_7 del dominio catalítico, el cual se describe más adelante.

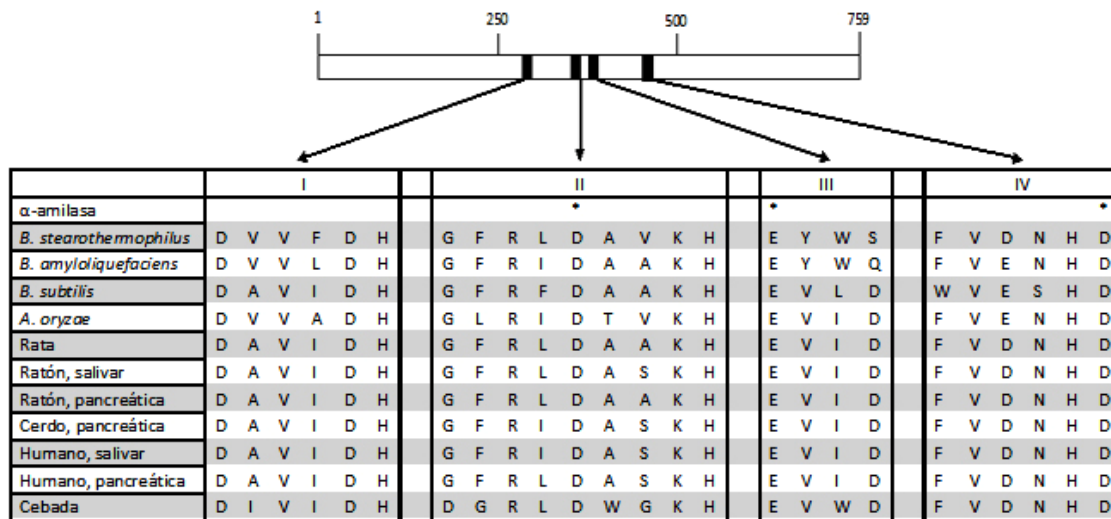


Figura 3.7 Alineamiento de 11 secuencias de aminoácidos de diferentes α -amilasas. Se observan las 4 regiones conservadas, * indica los residuos catalíticos [Modificado a partir de Nakajima, 1986]

Más tarde, tras el extenso análisis de secuencias de diferentes α -amilasas, Janeček propuso tres regiones adicionales cercanas al C terminal del dominio B y que pueden ser encontradas en las hebras β_2 y β_8 del dominio catalítico, y se denominaron región VI y VII respectivamente. Estas regiones pueden estar relacionadas con la estabilidad estructural de la enzima y se localizan alrededor del Asp 175 de la TAKA amilasa. Este aspartato tiene la función de unir calcio. [Janeček, 1992, 1994, 1995]

Estructura

Gracias a las estructuras tridimensionales de los complejos enzima-inhibidor, enzima-producto y enzima-sustrato, Svensson y su grupo en 1994, ilustraron la interacción con el ligando y los eventos catalíticos de siete enzimas amilolíticas, que incluyen la β -amilasa y la glucoamilasa. Fue así que realizaron la predicción de la estructura del dominio catalítico como un barril $(\beta/\alpha)_8$, el cual en el interior tiene un pliegue muy simétrico de ocho hebras β paralelas que están rodeadas por

ocho hélices. Este dominio es conocido como dominio A y se encuentra presente tanto en α -amilasas, como en ciclodextrina glucanotransferasas (Figura 3.5).

En la mayoría de los casos en que la estructura ha sido determinada por cristalografía, se ha visto la presencia de una gran asa entre la tercera hebra β y la tercera α hélice, algunas de estas asas pueden ser lo suficientemente largas para ser considerados dominios, y son nombradas dominio B. Esta asa tiene una estructura irregular que varía de enzima a enzima por lo que se ha discutido que no siempre debe de ser considerada como un dominio separado, sino como parte del barril. [MacGregor, 2001]

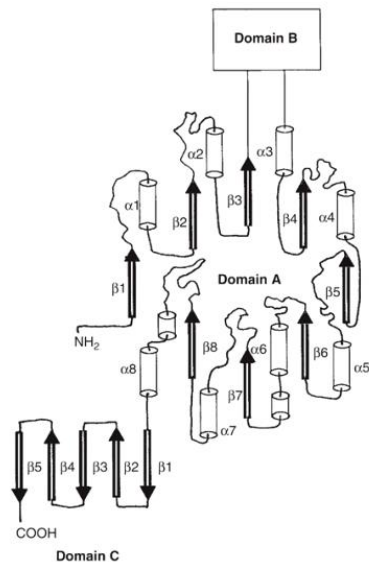


Figura 3.5 Representación de la estructura secundaria de la α -amilasa de la malta de cebada. Los cilindros representan las α -hélices y las flechas las laminas β . El barril $(\beta/\alpha)_8$ corresponde al dominio A. [Kadziola, 1994, adaptado por Robyt, 2009]

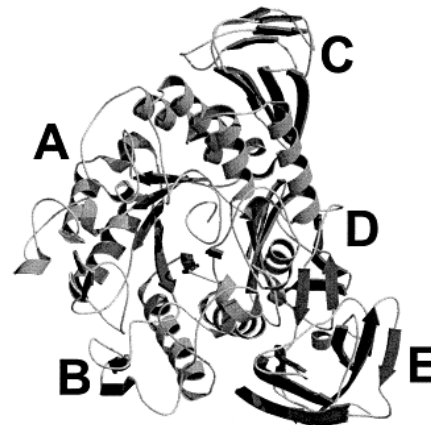


Figura 3.6 Modelo de cinta que ilustra los dominios individuales de la CGTasa de *Bacillus circulans*, A: dominio catalítico $(\beta/\alpha)_8$, B es un asa que sobresale del dominio A; C, D, y E son dominios de laminas β antiparalelas de los cuales E es el dominio de unión al almidón. [MacGregor, 2001]

La vasta mayoría de las α -amilasas presentan un dominio C, el cual sigue del dominio estructural barril $(\beta/\alpha)_8$. Este dominio está conformado por laminas β y se cree que estabiliza el dominio catalítico protegiendo los residuos hidrofóbicos del dominio A del solvente. También se ha sugerido que el dominio C puede estar involucrado en la unión del sustrato. [MacGregor, *et al.*, 2001]. Figura 3.5

Algunas α -amilasas tienen dominios adicionales no catalíticos, los dominios D y E, que se encuentran después del dominio C. No ha sido asignado algún rol al dominio D, pero se sabe que el dominio E se encuentra presente en CGTasas y amilasas. [MacGregor, *et al.*, 2001]. Figura 3.6 EL dominio E se encuentra en un pequeño porcentaje de estas enzimas y es llamado dominio de fijación al almidón (DFA) [Janeček, *et al.*, 1999], el cual se ha visto que puede estar conformado por arreglos desde un módulo hasta muchos módulos de unión a carbohidratos en tándem, ya sea unidos por espaciadores o contiguos. [Boraston, 2004]

Dominio de Unión a Carbohidratos

En la naturaleza existen numerosas fuentes de carbono que se presentan como estructuras complejas e insolubles, tenemos a la celulosa, la quitina y el almidón. La degradación enzimática de estas moléculas insolubles es una de las reacciones más importantes y estudiadas. En numerosos estudios de hidrólisis enzimática se ha observado que las enzimas que llevan a cabo esta reacción requieren de dominios adicionales conocidos como dominios de unión a carbohidratos [Machovic y Janeček, 2006]

Los primeros dominios de unión a carbohidratos reportados, los cuales facilitan la hidrólisis de polisacáridos, fueron aquellos que tenían la capacidad de unirse a celulosa y originalmente se llamaron CBDs (por sus siglas del inglés, Cellulose Binding Domains). Sin embargo, a medida que se descubrieron otros módulos con especificidad a otros sustratos se decidió llamarlos CBMs (por sus siglas en inglés, Carbohydrate Binding Modules) [Boraston, *et al.*, 2004]

En general, los módulos de unión a carbohidratos se encuentran definidos como una secuencia contigua de aminoácidos en una enzima con actividad de unión de carbohidratos y tienen un plegamiento discreto [CAZy, Carbohydrate Active enZYme, <http://www.cazy.org/>, Cantarel, *et al.*, 2009]

Los módulos de unión a carbohidratos se encuentran distribuidos ampliamente en proteínas de diversos organismos, ya sean plantas, hongos, bacterias o animales. Actualmente (21 de abril del 2014) los CBMs están clasificados por la base de

datos CAZy en 69 familias, existiendo además 199 módulos que aún no han sido clasificados hasta el momento. Dentro de las funciones atribuidas a estos módulos se encuentran la de promover la unión de polisacáridos insolubles con la enzima, atraer al polisacárido hacia el sitio activo [Boraston, *et al.*, 2004] y algunos tienen la capacidad de desestabilizar las interacciones intermoleculares sobre la superficie de las cadenas de un α -glucano [Southall, *et al.*, 1999].

Para citar a los módulos, se ha acordado que primero se antepongan las siglas CBM y después el número de la familia. Por ejemplo, para un módulo de la familia 25 se expresa como CBM25; sin embargo, también se puede anteponer el organismo de procedencia, por ejemplo, para el módulo de la amilasa formadora de maltohexosa que pertenece a la familia 25 y proviene del microorganismo *Bacillus halodurans* se expresa como *BhCBM25*.

Se ha visto que los CBMs en algunas enzimas se presentan en tándem, ya sean contiguos o separados por un conector, y que pueden pertenecer a la misma familia o incluso pueden ser combinaciones de diferentes familias. También pueden encontrarse en el extremo amino o el carboxilo del dominio catalítico. [Boraston, 2004].

En muchas glucósido hidrolasas (GH) se ha observado que la presencia de CBMs en tándem producen un incremento en sus constantes de afinidad (K_a) [Guillén, *et al.*, 2007, Boraston, *et al.*, 2002 y Linder, *et al.*, 1996]; sin embargo, existen casos en los que no se observa este efecto sobre las constantes de afinidad [Tomme, *et al.*, 1996].

La presencia de módulos en tándem se ve atribuida en algunas ocasiones a factores de estrés en el organismo de origen, por ejemplo, el incremento en la temperatura ocasiona la pérdida de afinidad de algunas enzimas de organismos termófilos, y la presencia de más módulos ayuda a compensar ésta pérdida de afinidad [Boraston, *et al.*, 2002].

Dentro de las 69 familias de CBMs antes mencionadas, se encuentra un pequeño grupo que tiene la capacidad de unirse al almidón insoluble, moléculas semejantes

al almidón o productos de degradación del almidón. Este grupo contiene a las familias CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM34, CBM41, CBM45, CBM 48 y CBM53 encontrados como módulos aislados, los cuales pueden formar parte de amilasas, sintasas y otras proteínas relacionadas con el metabolismo del glucógeno y el almidón.

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

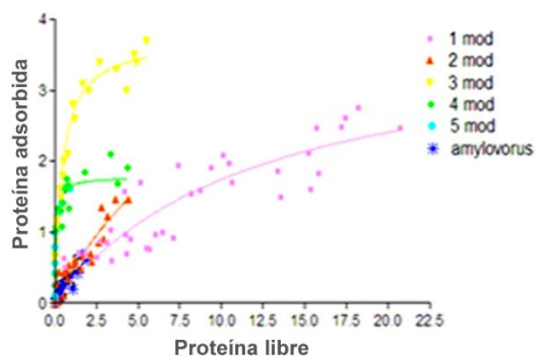


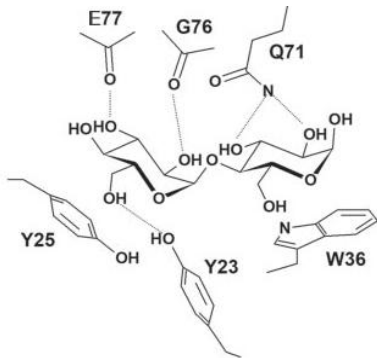
Figura 3.9. Curvas de adsorción de las unidades repetidas, donde 1 mod se refiere a un CBM26, 2 mod a dos CBM26, 3mod a tres CBM26, 4 mod a cuatro CBM26, 5 mod al LaDFA completo CBM26 y amylovorus a la amilasa completa

módulos actúan como un dominio de fijación al almidón (LaDFA) (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000)

Por su estructura primaria estos módulos pertenecen a la familia CBM26. En el LaDFA se ha visto que la capacidad de adsorción al almidón se incrementa en relación al número de módulos presentes, el incremento observado no es lineal mostrando un efecto sinérgico. Figura 3.9 [Guillén, *et al.*, 2007].

Se cree que el LaDFA se inmoviliza de forma no covalente sobre gránulos de almidón dando pie a la estabilización de las proteínas adsorbidas. Esta inmovilización puede llevarse a cabo de forma semejante a otras proteínas, por adsorción directa sobre superficies hidrofóbicas gracias a las interacciones que son capaces de establecer los aminoácidos sobre este tipo de superficies. Los

principales enlaces no covalentes que establecen las proteínas son los puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas [Reymond, 2006; Berg, *et al.*, 2008].



Se ha visto mediante mutagénesis dirigida que los residuos Y18, Y20 y W32 de un CBM26 del *LaDFA*, están involucrados en la interacción, sin embargo, la interacción se encuentra gobernada principalmente por el W32 dado que la mutación de este residuo inhabilita completamente la interacción [Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2009].

Figura 3.10. Interacción del BhCBM26 con maltosa. La adsorción del *LaDFA*, se puede ejemplificar con el CBM26 de *Bacillus halodurans*. Esta adsorción se encuentra mediada por un Triptófano y dos Tirosinas que se apilan con los anillos de piranosa del glucano. En la figura 3.10 el W36 y la Y25 forman interacciones hidrofóbicas con los anillos de piranosa, mientras que el Y23 contribuye con un puente de hidrógeno con el O6 de la glucosa. Q71 forma puentes de hidrogeno con el O2 y O3 de la glucosa apilada con el W36. Los carbonilos de la G76 y E77 forman puentes de hidrogeno con O3 y O2, respectivamente, de la glucosa unida contra la Y25. [Boraston, *et al.*, 2006].

Interacciones proteína-ligando

Las interacciones proteína-ligando están gobernadas por dos elementos importantes: el geométrico y el químico. El elemento geométrico se refiere a la complementariedad en las superficies de las moléculas involucradas durante la interacción, mientras que el elemento químico involucra a las interacciones favorables, en particular el efecto hidrofóbico, interacciones electrostáticas y la consideración del agua.

Las interacciones proteína-ligando son interacciones en las que se involucra una amplia gama de moléculas. El término ligando puede adoptar diferentes

significados ya que comprende una amplia variedad de moléculas como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos e inclusive combinaciones de éstos. Los ligandos pueden ser muy pequeños y simples, o incluso muy grandes y complejos.

Quizá el aspecto más importante en este tipo de interacciones es que el ligando interactúa con la proteína de manera reversible, es decir, no covalente; además, que su rol biológico puede ser modulado. [Harding y Jiang, 2001]

Para estudiar las interacciones proteína-ligando existen varias técnicas que nos pueden aportar información de la estequiometría, constantes de disociación (K_d) o de asociación (K_a), además de información estructural. Muchas de estas técnicas requieren de instrumentos especializados y de análisis de datos complejos, las más utilizadas son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la cristalografía por rayos X, dicroísmo circular (CD del inglés Circular Dichroism) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC del inglés Isothermal Titration Calorimetry).

Una de las técnicas más empleadas para el estudio de los CBMs es el ITC debido a la rapidez y relativa facilidad con la que se lleva a cabo el ensayo. Mediante ITC se mide directamente el calor absorbido o liberado durante la interacción, y por una regresión no lineal se puede conocer la constante de unión (K_a), la entalpía (ΔH), y la estequiometría o número de sitios de unión (n). Gracias a los parámetros obtenidos se puede calcular la entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs (ΔG) (Ver apéndice VI para aspectos técnicos).

Calorimetría en los módulos de unión al almidón

El CBM20 de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnCBM20) ha sido uno de los CBMs más estudiado ya que fue el primero en ser descubierto. Es importante resaltar que de este módulo se sabía de la presencia de dos sitios de unión antes de conocer su estructura; esto gracias a los estudios de Belshaw y Williamson (1993) que mediante titulaciones por diferencia de UV, con oligosacáridos de diferente longitud, observaron que a medida que se incrementa el número de glucosas en la cadena aumenta la constante de afinidad. Para el monosacárido

glucosa obtuvieron una $K_a=3.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y para un oligosacárido de 17 glucosas obtuvieron $K_a=2.86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, pero con un oligosacárido con 20 glucosas la afinidad no aumentó. Además, observaron que la β -ciclodextrina (β -CD), que es un análogo estructural del almidón, presentaba una constante de afinidad mayor, de $5.88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

En 1994 Sigurskjold, *et al.*, confirmaron mediante ensayos de ITC la presencia de dos sitios de unión en el AnCBM20. Esto lo realizaron mediante ensayos con tres análogos de la tiopanososa (GlcSGlc₂, GlcSGlc₃ y GlcSGlc₄), maltoheptaosa y β -CD. Las afinidades obtenidas para cada uno de los sitios del CBM, fueron desde $K_{aI}=3.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para el sitio I y $K_{aII}=0.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para el sitio II titulado con GlcSGlc₂ hasta $K_{aI}=5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el sitio I y $K_{aII}=5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el sitio II con β -CD. Se observó que la interacción con oligosacáridos es favorable entálpicamente y desfavorable entrópicamente, y por lo tanto espontánea. Adicionalmente, coincidieron que el incremento en el número de carbonos de un oligosacárido aumenta la afinidad del CBM.

Para comparar la $K_{a\text{-app}}$ obtenida por Belshaw y Williamson, Sigurkjold hizo un ajuste con las constantes de afinidad que obtuvo mediante ITC con β -CD (K_{aI} y K_{aII}), el valor obtenido para los dos sitios fue de $4.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, valor muy semejante al obtenido por Belshaw ($5.88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Sin duda, es importante resaltar que en ambos estudios se concluyó que la mayor afinidad se da con la β -CD.

En el 2005 Machovic, *et al.*, reporta que el CBM21 tiene un plegamiento muy semejante al del CBM20. Por su parte Jiang, *et al.*, en el 2012, caracterizaron los dos sitios de unión del modulo de unión a carbohidratos de *Rizopus oryzae* (RoCBM21). Emplearon para el ensayo de ITC tres análogos del almidón como ligando, β -ciclodextrina, amilosa EX-I (compuesta de 17 unidades de glucosa) y G7 (compuesta de 7 unidades de glucosa); obteniendo la mayor afinidad nuevamente con la β -ciclodextrina ($K_a= 4.83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), seguido de la amilosa EX-I ($K_a=2.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) y la G7 ($K_a= 5.07 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).

Afinidad CBM25 y CBM26

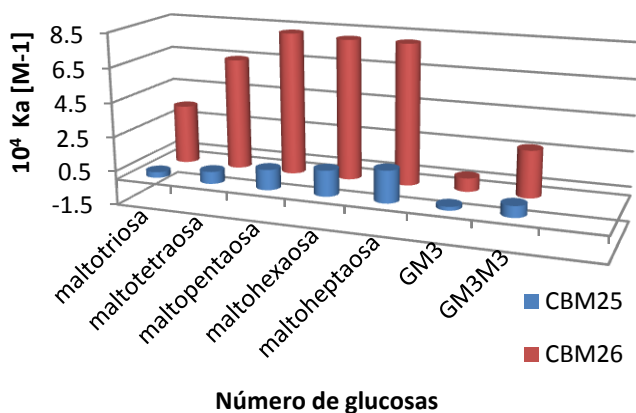


Figura 3.11. Constantes de afinidad del CBM 25 y CBM26, se observa el incremento de la afinidad a medida que aumenta el número de carbonos en los oligosacáridos, sin embargo cuando se utilizan oligosacáridos ramificados la afinidad disminuye. (Boraston, *et al.*, 2006)

de estos módulos se da con una estequiometría de 1 a 1, esto indica un solo sitio de unión por CBM; 2) la constante de afinidad de estos dos módulos al unirse a diferentes sustratos aumenta a medida que aumenta la cadena de glucosas; 3) que existe una preferencia por el sustrato lineal sobre el ramificado (GM3 y GM3M3, ver apéndice I). Desafortunadamente el estudio no se realizó con β -CD.

Por otro lado, el comportamiento termodinámico para la interacción del CBM25 y el CBM26 con los diferentes azúcares fue entálpicamente favorable y entrópicamente desfavorable; que como se ha visto, es una característica particular de los CBMs. [Boraston, *et al.*, 2004]

El único trabajo de ITC reportado para un CBM26, familia a la que pertenece el LaCBM, fue realizado por Boraston, *et al.*, en el 2006 con los módulos aislados, de la alfa amilasa de *Bacillus halodurans* la cual contiene un tándem de CBM25-CBM26. En este estudio se realizaron ITCs independientes del CBM25 y del CBM26 con azúcares de diferentes longitudes. Los autores reportan varios hallazgos: 1) que la interacción CBM-ligando para cada uno

Objetivo general

Caracterizar las interacciones entre el dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *L. amylovorus* (LaDFA) con la β -ciclodextrina; obteniendo su estequiometría, factibilidad de interactuar, espontaneidad y posibles cambios conformacionales.

Objetivos particulares

- Determinar los parámetros de unión (ΔH , n , ΔS , ΔG) de la interacción de la β -ciclodextrina con el LaDFA, de la α -amilasa de *L. amylovorus* mediante ITC.
- Determinar la estequiometría de la interacción.
- Establecer si existen cambios conformacionales como consecuencia de la interacción con el carbohidrato.

Justificación

La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* está conformada por un tándem de cinco LaCBM26s, un arreglo inusual en las amilasas. Mediante estudios bioquímicos de los módulos que conforman esta amilasa se ha demostrado que existe un incremento en la afinidad a medida que aumenta el número de módulos presentes.

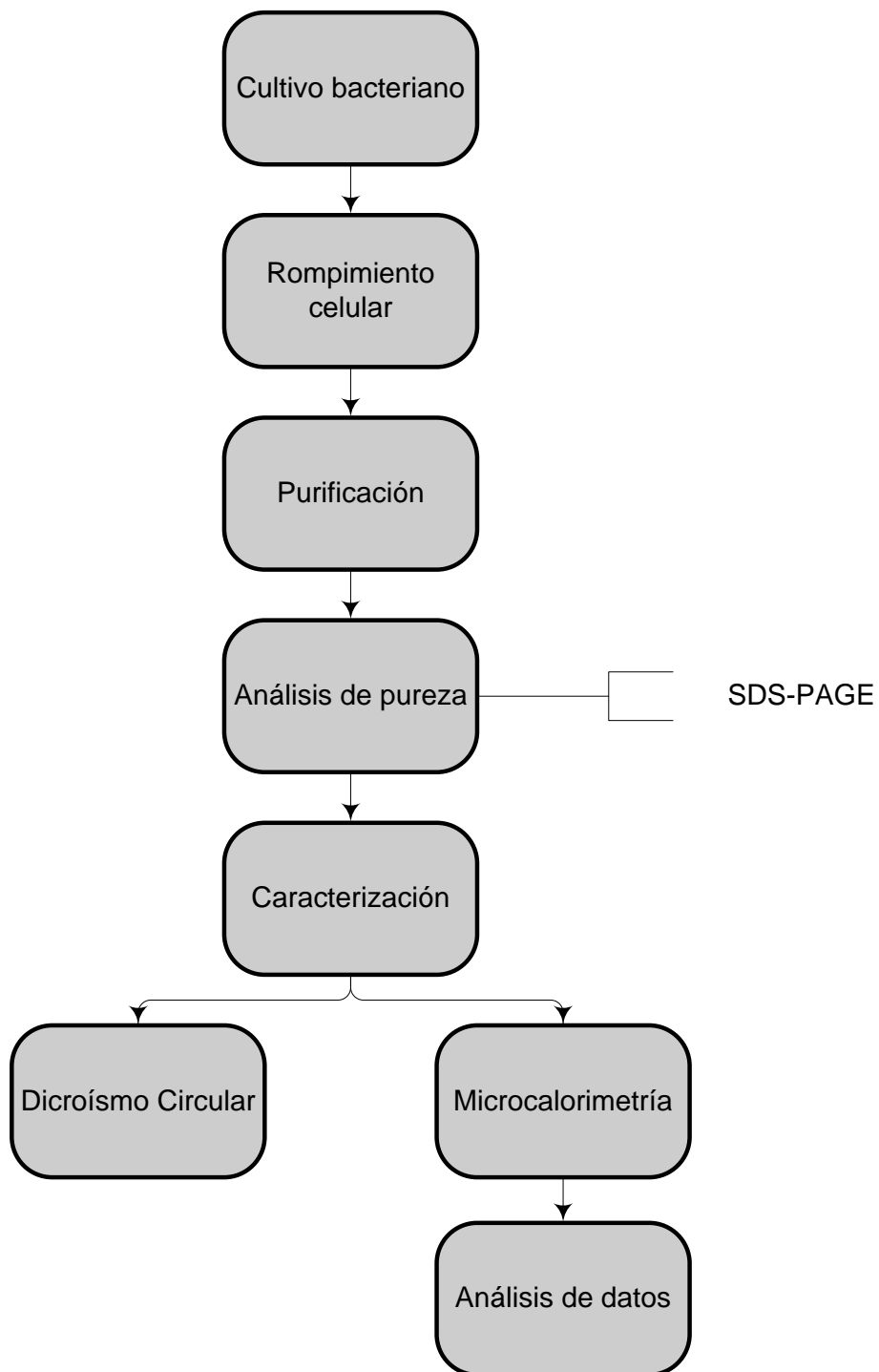
Debido a la carencia de una estructura resuelta por cristalografía, no se conoce el arreglo espacial de los módulos en esta amilasa ni el mecanismo de interacción. Una forma de obtener un acercamiento a este mecanismo es por medio de la Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y el Dicroísmo Circular (DC), los cuales permiten obtener los parámetros termodinámicos de la interacción y observar cambios conformacionales asociados a la presencia del sustrato, sin la necesidad de obtener un cristal.

Este proyecto permitirá conocer las bases termodinámicas y estructurales del reconocimiento de carbohidratos por parte de los cinco LaCBM26s de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

Hipótesis

*Si la adsorción del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* sobre una matriz de almidón se lleva a cabo mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, al realizar nuestro ensayo de ITC con β -CD observaremos una entalpía negativa, además tendremos un decremento en la entropía. Adicionalmente, observaremos constantes de afinidad de mayor magnitud a las reportadas en otros módulos, tal vez mostrando un efecto sinérgico.*

IV. Metodología



Microorganismo y vectores

El vector pQE31-DFA previamente construido [Santiago, *et al.*, 2005] es un vector de expresión bajo la regulación del operón lac; este vector contiene dos operadores lac, el gen de ampicilina como gen de resistencia y un tallo de histidinas en el N-terminal del LaDFA. El tamaño del vector es ~5.8 kpb.

La expresión del LaDFA se hizo en *Escherichia coli* XL1blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet')], transformada con el vector.

E. coli XL1blue con el vector pQE31-DFA se creció a 29°C en 1L de medio LB con ampicilina 100μg/mL hasta una DO a 600nm de 0.804. Se indujo el cultivo con IPTG 0.4mM por 4 horas. Trascurrido este tiempo las células se recuperaron centrifugando por 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet se lavó con amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6, Imidazol 25mM, NaCl 0.5M.

Purificación del DFA de la α-amilasa de Lactobacillus amylovorus

Todo el proceso se realizó en hielo. El pellet se resuspendió en 5mL de amortiguador de lisis (tampón de fosfatos 20mM, 0.5M de NaCl y 25mM de Imidazol con inhibidor de proteasas sin EDTA, SIGMA). El pellet se sonicó, en tubos falcón de 15mL, dando 3 pulsos de 10 segundos con 1 minuto de reposo entre cada pulso con una amplitud de onda de 60Hz y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante mientras que el pellet restante fue resuspendido en 2mL del amortiguador de lisis. Nuevamente se sonicó, dando 3 pulsos de 20 segundos con un minuto de reposo entre cada pulso.

Se mezclaron ambos sobrenadantes y se llevaron a un volumen de 10mL con el amortiguador de lisis, se añadió tritón al 20% para obtener una concentración final de 1%. El extracto obtenido se mantuvo en agitación suave por una hora a 4°C.

Se eliminaron los sólidos remanentes por centrifugación a 13000 por 25 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.8µm seguida de una filtración a través de una membrana de 0.45µm.

La purificación del DFA se realizó en una columna de níquel HisTrap HP de Amersham de 1 mL. La columna se equilibró con amortiguador de unión (20mM fosfatos, 25mM de imidazol y 0.5M de NaCl) en el cromatógrafo FPLC AKTA (Pharmacia) a un flujo de 1mL/min. Se inyectó el extracto proteico y se lavó la columna con amortiguador de unión a un flujo de 1mL/min hasta que la DO_{280nm} descendió a cero.

La proteína fue eluída con el amortiguador de elución, el cual contenía 20mM fosfatos, 500mM imidazol y 0.5M NaCl, en un gradiente de 0 a 100% de Imidazol con una extensión de 100mL y a flujo de 1mL/min.

Para eliminar las proteínas contaminantes se probaron los siguientes protocolos:

a) *Diafiltración con tubo Viva spin 4et 15mL*

Se realizaron 5 lavados de 5ml con amortiguador fosfatos en ciclos de 10 minutos a 3000g por 10 minutos, y en el último lavado se llevó a un volumen final de 0.5mL.

b) *Diálisis*

Las bolsas de diálisis se lavaron con 50mL de agua destilada esterilizada en un vaso de precipitados con agitación suave por 15 minutos dos veces.

La diálisis del LaDFA se hizo en frío con membranas de 10 000 MWCO y 50 000 MWCO por 21 y 24 horas respectivamente; se emplearon 400 volúmenes de amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6 con agitación suave.

c) *Cromatografía exclusión molecular*

Se utilizó la columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution, la cual fue equilibrada a un flujo de 0.6ml/min con amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6 previamente filtrado por membrana 0.22 μ m y degasificado por 1 hora, a 4°C. Todas las fracciones obtenidas tras la purificación por níquel se concentraron en un tubo viva spin 4et 15mL 10 000 MWCOPEs hasta un volumen de 1.2mL y se inyectó. El LaDFA atraviesa la columna con 45mL de amortiguador. Las fracciones se colectaron en volúmenes de 1mL. Se adicionó de inhibidor de proteasas.

Cuantificación de proteína

La proteína fue cuantificada por DC Protein Assay de Biorad. El ensayo se basa en la reacción alcalina de una proteína con tartrato cúprico y el reactivo de Folin. El color desarrollado es debido primordialmente a la tirosina y triptófano y, en menor medida, cistinas, cisteínas e histidinas. Ver método en el apéndice III.

La pureza de la proteína fue verificada en SDS-PAGE [Gallagher, 2012] y Western blot (Towbin, *et al.*, 1979) apéndice III.

Cuantificación de azúcares totales

La concentración de β -CD se corroboró mediante la cuantificación de azúcares totales por el método de fenol sulfúrico [DuBois, *et al.*, 1956] Ver método en el apéndice III.

ITC

La proteína pura se dializó por 21 horas a 4°C en una membrana con corte de 10000 MWCO contra 400 volúmenes de amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6 y agitación suave. La β -CD se preparó a una concentración de 37 veces la concentración del LaDFA utilizando como disolvente el amortiguador con el que se dializó la proteína.

El ensayo de calorimetría se realizó en un microcalorímetro VP-ITC de Microcal, en una celda de muestra de 1.4mL. El ensayo consistió en la titulación del LaDFA

con la solución de β -CD. Para el blanco se colocó en la celda de muestra amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6 y en el sistema de inyección la disolución de β -CD. Las condiciones empleadas para la operación del microcalorímetro son las siguientes:

	Primer inyección	Inyecciones subsecuentes
Inyecciones	1	29
Duración (segundos)	4	10
Espaciado entre inyecciones (segundos)	300	360
Periodo de filtrado (segundos)	2	2
Volumen de la inyección	2 μ L	5 μ L
Temperatura	25°C	
DP	20 μ cal	

Ver apéndice V para conocer los aspectos técnicos de la calorimetría de titulación isotérmica.

Dicroísmo circular (CD)

La estructura del *LaDFA* se monitoreó por dicroísmo circular en presencia y ausencia de la β -CD. El ensayo se realizó en un espectropolarímetro Jasco J-720 en una celda de 0.1 cm de paso de luz a una temperatura de 25°C. Cada espectro se obtiene por triplicado en la región del UV-lejano (190-260 nm).

Antes de utilizar la proteína fue dializada extensamente en amortiguador de fosfatos 10mM pH 7.6 y su concentración ajustada a 180.71 μ g/mL. La β -CD se disolvió en el amortiguador de diálisis previamente filtrado a una concentración final de 7.93mM. Para el espectro de CD en presencia del sustrato, a la celda con 400 μ L de volumen de muestra se le agregaron 2 μ L de la disolución de β -CD y se agitó por inversión durante 20 segundos. Los espectros del *LaDFA* y del *LaDFA* ligado con β -CD fueron corregidos mediante la sustracción de la línea base. Ver apéndice VI para ajustar los espectros de absorción.

Parámetros del polarímetro		
Longitud de onda inicial	260	nm
Longitud de onda final	190	nm
Resolución	1	nm
Velocidad (nm/min)	20	
Acumulación	3	
Respuesta	1	segundo
Ancho de banda	1nm	nm
Sensibilidad	20	miligrados

Para información de preparación de medios y disoluciones, ver el apéndice II.

V. Resultados y Discusión

El LaDFA se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. La figura 5.1 muestra la proteína eluida, se observa una banda intensa entre las bandas del marcador de peso molecular (MPM) de 97 400 y 66 200Da. El LaDFA tiene un peso molecular alrededor de los 54KDa; sin embargo, se ha visto que presenta una migración aberrante, migrando a un peso molecular superior al esperado. Esto se ha observado de igual forma con la amilasa y otras construcciones derivadas de la amilasa. También se observó la presencia de otras bandas debajo del LaDFA (figura 5.1), identificándose por Western Blot que algunas de estas bandas son de la degradación del DFA (datos no mostrados).

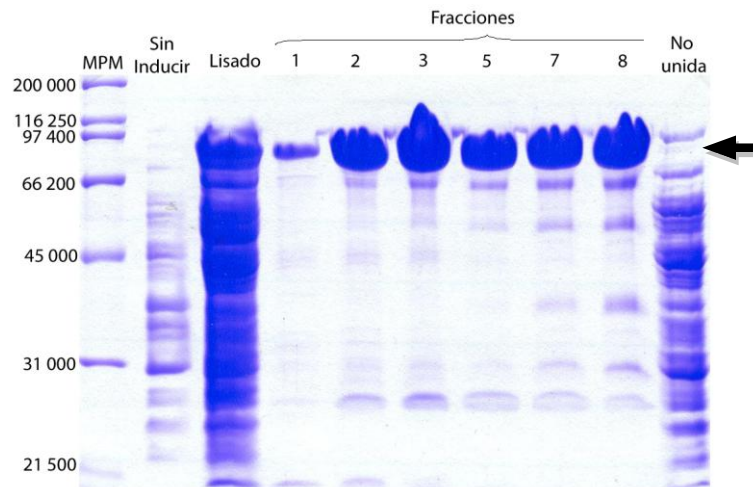


Figura 5.1. SDS-PAGE 10% que muestra los eluatos obtenidos durante la purificación por afinidad a níquel de LaDFA a partir de 1L de cultivo inducido 4 horas a 0.4mM de IPTG. MPM: Marcador de peso molecular (Broad-Range, Bio-Rad). Sin inducir: Lisado celular antes de la inducción. Lisado: lisado celular 4h después de la inducción. Fracciones 1-8 Fracciones obtenidas de la columna His-Trap (Bio-Rad) en el gradiente de imidazol. 10) Proteínas que no se unieron a la columna HisTrap. La flecha indica la banda que corresponde al LaDFA.

Para eliminar las bandas contaminantes del LaDFA se probaron tres métodos: Diafiltración, cromatografía de exclusión molecular y diálisis.

Diafiltración. Tubo Viva spin 4et 15mL 50 000MWCO

Las fracciones que incluían la mayor cantidad de proteína con menos bandas contaminantes fueron concentradas en un tubo de diafiltración. En la figura 5.2 observamos que esta metodología no es la adecuada para eliminar las bandas de degradación, ya que a pesar del proceso no logramos eliminar la degradación.

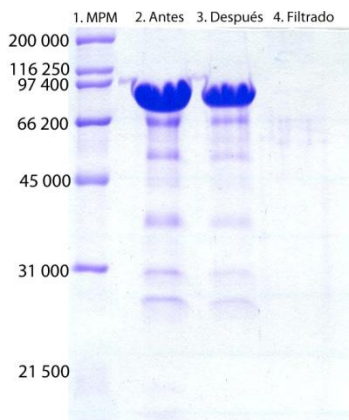


Figura 5.2. SDS-PAGE 10% del proceso de diafiltración del *LaDFA* en el tubo viva spin 4et 15mL de 50 000 MWCO. Carril 1, marcador de peso molecular ((Broad-Range, Bio-Rad), carril 2, el *LaDFA* antes de diafiltrar, carril 3, el *LaDFA* sometido a la diafiltración y carril 4, filtrado.

Columna de exclusión molecular HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution.

La purificación del *LaDFA* por exclusión molecular se realizó en dos pasos: Primero la proteína semipura se pasó por la columna Sephacryl S-200 a un flujo de 0.6mL/min. En la figura 5.4 se puede observar la disminución de bandas contaminantes aunque permanece una que migra por debajo de los 31 000KDa (figura 5.4). Las fracciones con mayor cantidad de *LaDFA* se concentraron 5 veces en un tubo vivaspin 4et y se pasaron nuevamente por la columna de exclusión molecular, pero a un flujo a 0.2mL/min. En la figura 5.5a se observan las fracciones obtenidas, las fracciones 9-12 muestran la proteína pura, la figura 5.5b muestra el western blot correspondiente.

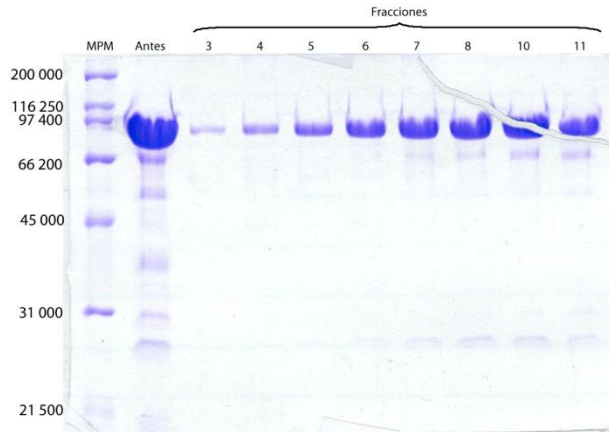


Figura 5.4. SDS-PAGE 10%, Carril 1, marcador de peso molecular (Broad-Range, Bio-Rad); carril 2, LaDFA diafiltrado y concentrado; carriles 3-10 fracciones obtenidas tras pasar por la columna de exclusión (S200, Pharmacia) a flujo de 0.6mL/min

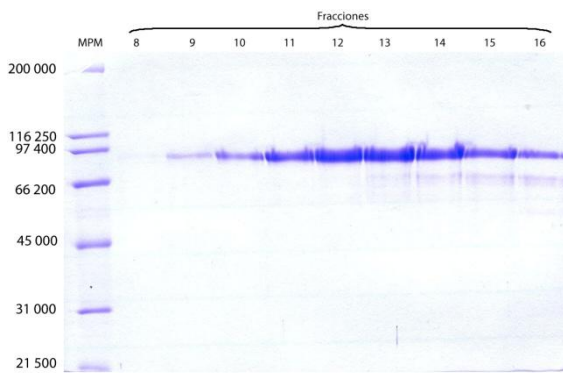


Figura 5.5a. SDS-PAGE 10% de las fracciones obtenidas al purificar en la columna S-200 a un flujo de 0.2mL/min

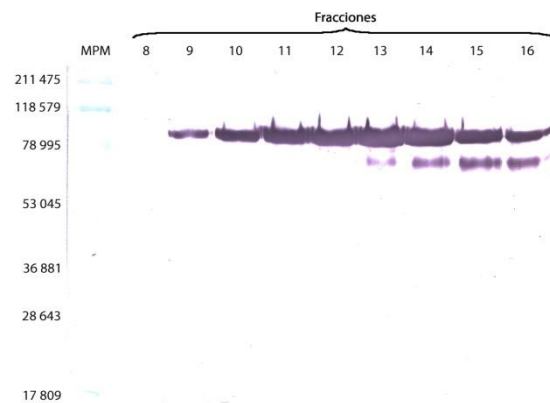


Figura 5.5b. Western blot de las fracciones de la figura 5.5a. Ver apéndice III para consultar la metodología

Diálisis

La fracción 16 de la purificación por exclusión molecular (figura 5.5 a, b) se dializó durante 21 horas en una membrana de 10,000 MWCO contra amortiguador de fosfatos 20mM. No esperábamos la desaparición de las bandas de degradación; sin embargo, se buscaba observar el comportamiento del LaDFA a través de una extensa diálisis. Figura 5.6a

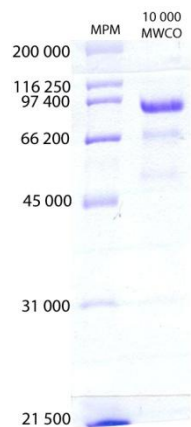


Figura 5.6a SDS-PAGE 10% de la diálisis del *LaDFA* a través de una membrana de 10,000MWCO durante 21 horas.

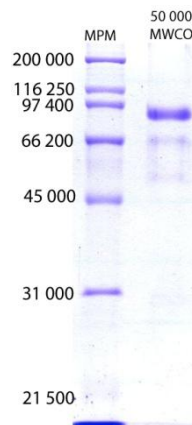


Figura 5.6b. SDS-PAGE 10% de la diálisis del *LaDFA* a través de una membrana de 50,000 MWCO durante 24 horas.

Posteriormente la misma muestra se dializó en una membrana de 50,000MWCO contra amortiguador de fosfatos 20mM pH 7.6 por 24 horas; sin embargo, no se observó que la diálisis ayudase para eliminar las bandas que se encontraban por debajo del *LaDFA*. Figura 5.6b

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Para realizar el los experimentos de ITC fue necesario igualar las soluciones en las que se encontraban disueltas la proteína y el ligando. El *LaDFA* se dializó contra amortiguador de fosfatos 20mM pH7.6 por 20 horas en una membrana de diálisis de 10,000 MWCO. Al terminar la diálisis, se preparó el ligando con el mismo amortiguador recuperado. Con este amortiguador se lavó el equipo y, posteriormente, se hizo un blanco para eliminar el error debido al calor de dilución (ver el apéndice V).

Las concentraciones empleadas se muestran en la Tabla 5.1. El *LaDFA* que se empleo para el ensayo de ITC se presenta en la figura 5.7a.

Tabla 5.1. Concentraciones empleadas para el ensayo de ITC	<i>LaDFA</i>	Blanco
concentración en la jeringa [μM] ($\beta\text{-CD}$)	234.0	234.0
concentración en la celda [μM] (<i>LaDFA</i>)	6.22	0

En la figura 5.7 se observa la isoterma obtenida. La primera inyección es de un menor volumen para evitar el efecto de dilución en la jeringa, es decir, que el ligando se diluya por la presencia de amortiguador en el sistema de inyección y así asegurar de que la segunda inyección contenga la concentración deseada.

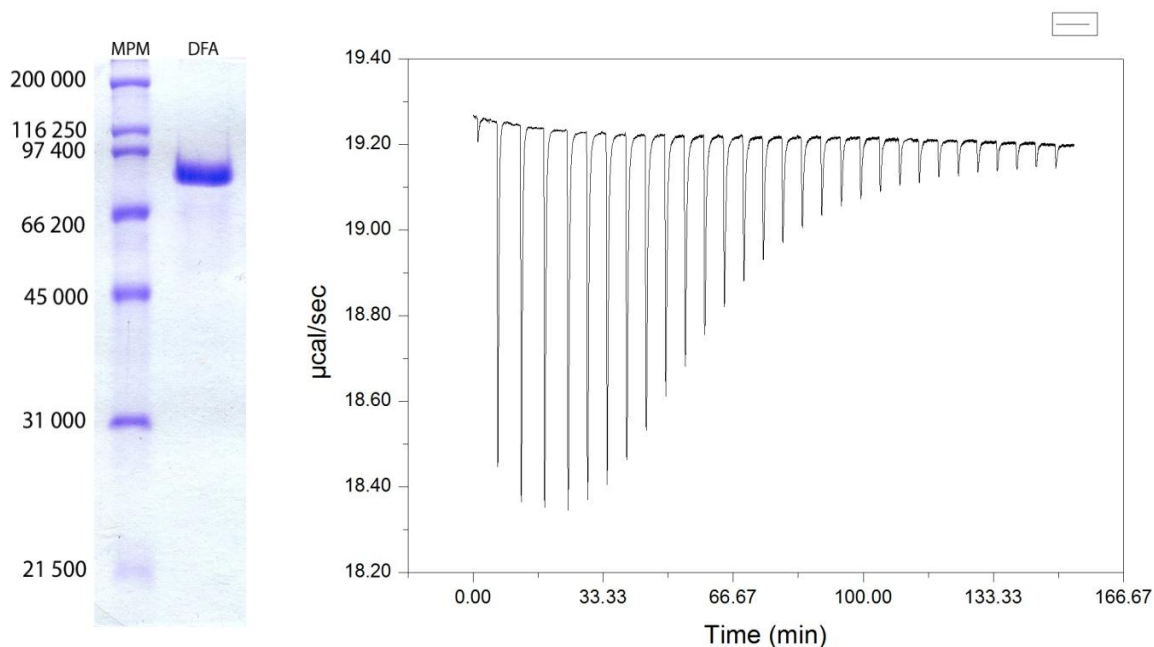


Figura 5.7a. Gel SDS-PAGE 10% del *LaDFA* empleado para ITC. Figura 5.7b Isotherma del *LaDFA* generado mediante la titulación del *LaDFA* con la β -CD a 25°C.

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante el programa Origin 7 con las herramientas de microcal para ITC. Este programa al ajustar los datos nos proporciona una curva de calor liberado por mol de ligando inyectado (calorías/mol de inyectando) contra la razón molar (ligando/macromolécula). Los modelos de ajuste se muestran en el apéndice V.

El ajuste de los datos experimentales se hizo bajo los modelos de un sitio, y, 3, 4 y 5 sitios secuenciales (ver apéndice IV). El ajuste con el modelo de un sitio muestra una constante de afinidad de $2.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para el *LaDFA*, mientras que el ajuste realizado para un CBM26 muestra una constante de $5.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Morales, J., datos no publicados), lo que indica que la presencia del tándem tiene un efecto

sobre la constante de afinidad. La K_a observada puede ser debido a un efecto aditivo o sinérgico.

Por otro lado, con el ajuste de 5 sitios secuenciales, modelo al que se ajustan mejor los datos, muestra un notorio incremento en las constantes, teniendo como constante menor $1.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y como constante mayor $3.74 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Al comparar estas constantes con la obtenida dentro del grupo de trabajo para un módulo ($5.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), y comparadas con las obtenidas por Sigurkjold de $4.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para el AnCBM20, y por Jiang de $4.83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el RoCBM21 con el mismo ligando; vemos que los módulos en tándem son, sin lugar a dudas, mucho más afines a la β -CD que los demás por separado.

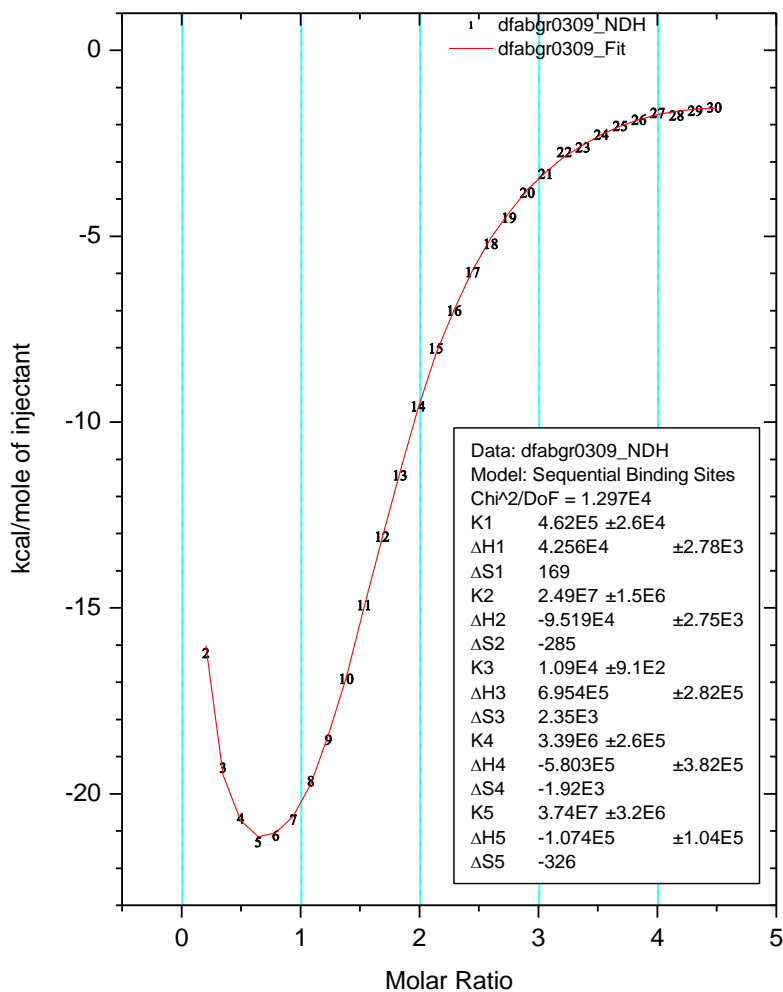


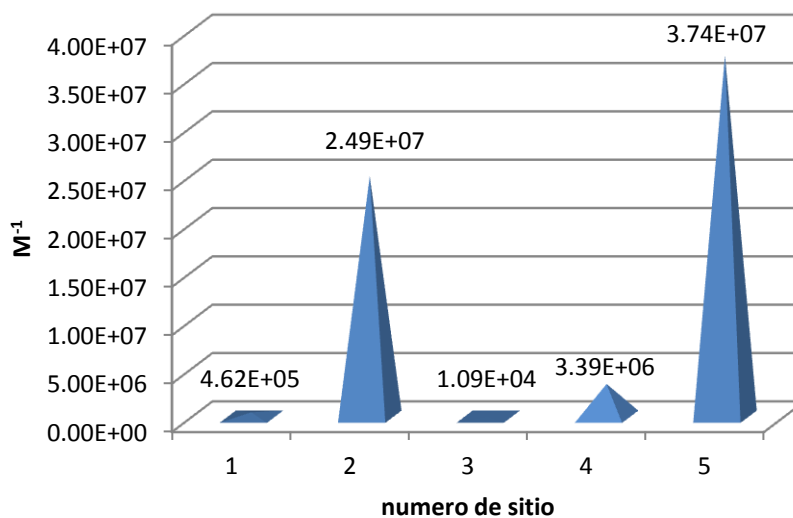
Figura 5.8. Regresión no lineal del LaDFA con β -CD para 5 sitios secuenciales

Para visualizar la espontaneidad de la interacción calculamos la energía libre de Gibbs (Tabla 5.2), que nos muestra que para cada sitio la interacción ligando-proteína es espontánea. La magnitud de este valor es semejante para todos los sitios, indicando que hay una compensación entálpica-entrópica.

Tabla 5.2. Parámetros termodinámicos

# sitios	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	ΔG
1	4.26E+04	169	-7.39E+03
2	-9.52E+04	-285	-9.65E+03
3	6.95E+05	2.35E+03	-5.27E+03
4	-5.80E+05	-1.92E+03	-8.52E+03
5	-1.07E+05	-326	-9.88E+03

K_a del LaDFA

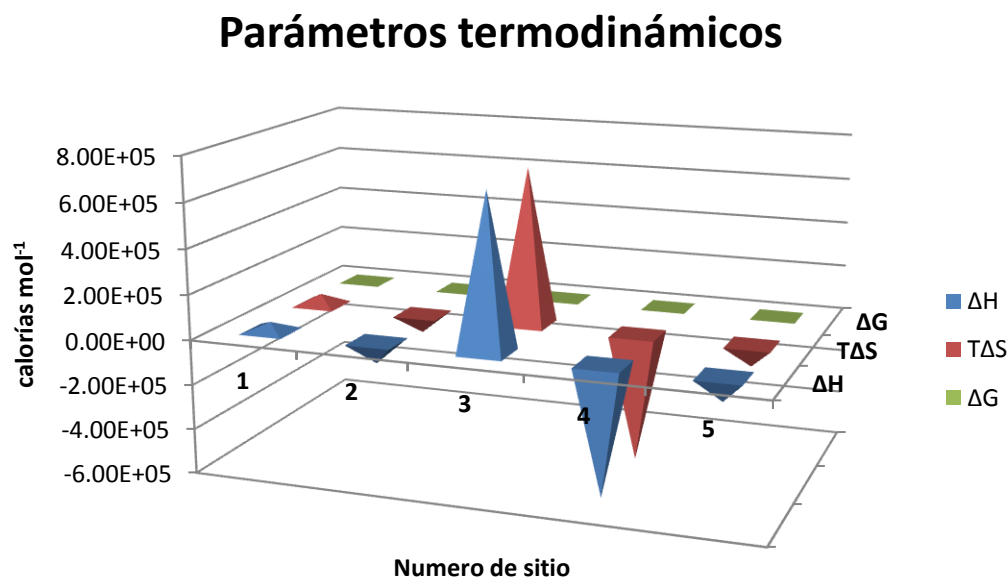


Gráfica 5.1. K_a de cada uno de los sitios. El sitio 5 es el de mayor afinidad, seguido del 2, 4, 1 y 3 en orden decreciente de afinidad

En la gráfica 5.1 se muestran las K_a de los 5 sitios, comparando la K_a del sitio con mayor afinidad (sitio 5) contra el sitio de menor afinidad (sitio 3), se observa una diferencia de 3431 veces. Este tipo de comportamiento nos puede indicar que

existe un ajuste en las constantes de afinidad debido a la unión del sustrato por un posible cambio conformacional al momento de unir el ligando. Sin embargo, cabe destacar que el número de sitio no representa exactamente el orden espacial de los sitios dentro del LaDFA. Tampoco sabemos cual sitio se ocupa primero, ya que los 5 sitios presentes en el LaDFA son idénticos, por lo que cada uno tiene la misma probabilidad de ocuparse primero, a menos que alguno se encuentre más disponible que otros, condición que no se puede identificar con esta técnica.

En la gráfica 5.2 se muestra tanto la magnitud entálpica como la entrópica con la que se rigen los sitios del DFA de *Lactobacillus amylovorus*. Vemos que para el sitio 1 y 3 se presentan interacciones endotérmicas de diferente magnitud, siendo el sitio 3 el más endotérmico, además ambos sitios están favorecidos entrópicamente, pero el sitio 3 es el más entrópico. Los sitios 2, 4 y 5 son exotérmicos de magnitudes muy diferentes, de los cuales, el sitio 4 es el más exotérmico; además estos tres sitios son desfavorecidos entrópicamente, pero, el sitio 4 es el más desfavorecido.



Gráfica 5.2. Parámetros termodinámicos de los sitios de unión del LaDFA en azul se presenta la entalpía, en magenta la entropía y en verde la energía libre de Gibbs. Todo a la temperatura del ensayo (25°)

Ladbury y Doyle (2004) mencionan que los cambios conformacionales son muy desfavorables entrópicamente, conllevando a ser un indicativo de un ajuste inducido durante la interacción, además que las interacciones rígidas también incurren en un decremento en la entropía, pero en un menor grado. Esto es porque siempre hay pérdida en los grados de libertad, refiriéndose como grados de libertad al movimiento rotacional y translacional, o de flexibilidad cuando dos moléculas están juntas para formar un complejo. En la gráfica 5.2 se muestra la magnitud de las entropías de los sitios. El sitio 4 es muy desfavorable entrópicamente comparado con los demás sitios lo que puede revelar que hay una pérdida en los grados de libertad entre las moléculas que se encuentran formando la interacción, esto nos puede indicar que existe un cambio conformacional, lo que facilita el aumento de la afinidad.

Adicionalmente podemos analizar el comportamiento de los sitios con base a la tabla 5.3

Tabla 5.3. Variación de la reacción de espontaneidad (signo de ΔG) con signos de ΔH y ΔS (Voet, 2007)		
ΔH	ΔS	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
-	+	La reacción es favorecida tanto por la entalpía (es exotérmica) como la entropía. Es espontánea (exergónica) a todas las temperaturas
-	-	La reacción es favorecida por la entalpía pero desfavorecida por la entropía. Es espontánea sólo a temperaturas inferiores a $T = \Delta H / \Delta S$
+	+	La reacción se ve desfavorecida por la entalpía (es endotérmica) pero favorecida por la entropía. Es espontánea sólo a temperaturas por encima a $T = \Delta H / \Delta S$
+	-	La reacción está desfavorecida tanto por la entalpía como por la entropía. No es espontánea (es endergónica) a todas las temperaturas.

Al analizar la tabla anterior podemos concluir que para el sitio 1 y 3 la reacción es espontánea a temperaturas por encima de -21 y 23 °C respectivamente, para cada sitio. Por otro lado, para los sitios 2, 4 y 5 la reacción es espontánea a temperaturas por debajo de 61, 29 y 55 °C, respectivamente, para cada sitio.

Tabla 5.3 Parámetros termodinámicos

# sitios	ΔH	ΔS	T [=] K	T [=] °C
			$\Delta H/\Delta S$	$\Delta H/\Delta S$
1	4.26E+04	169	252.07	-21
2	-9.52E+04	-285	334.04	61
3	6.95E+05	2.35E+03	295.74	23
4	-5.80E+05	-1.92E+03	302.08	29
5	-1.07E+05	-326	328.22	55

Con todo lo anterior podemos decir que el sitio 3 es el primero en ocuparse. Esto por la baja K_a y a que nuestra temperatura de trabajo fue 25°C, la interacción del sitio 3 con la β -CD se encuentra favorecida entrópicamente a pesar de ser endotérmica; sin embargo, no implica que tal sitio sea el que ocasione el cambio estructural para el incremento de las afinidades de los sitios 2 y 5, aunque es posible que ocasione un ligero cambio al igual que el sitio 1. El sitio 4 debido a la desfavorable entropía que muestra puede ser el que ocasione el cambio conformacional, y en consecuencia facilitar que los sitios incrementen su afinidad al encontrarse más disponibles.

Dicroísmo circular (DC)

Se realizó un ensayo de dicroísmo circular para detectar algún cambio conformacional en el *LaDFA* después de unir a la β -CD. En la figura 5.10 se presentan los espectros de dicroísmo circular del *LaDFA* y de éste mismo en presencia de β -CD, ambos espectros se obtuvieron en la región lejana del espectro de UV (ver apéndice VI). El *LaDFA* muestra un mínimo a 201nm, un máximo a 221nm y un hombro a los 237nm, y el espectro del *LaDFABCD* tiene un mínimo a 201nm, un máximo a 223nm y un hombro a 234nm. A simple vista se puede observar una perturbación en la región que comprende de los 220 a los 240nm. Se sabe que en la región que comprende de los 225 a los 235nm los aminoácidos aromáticos, Tyr y Trp, muestran bandas positivas [Woody, 1994]

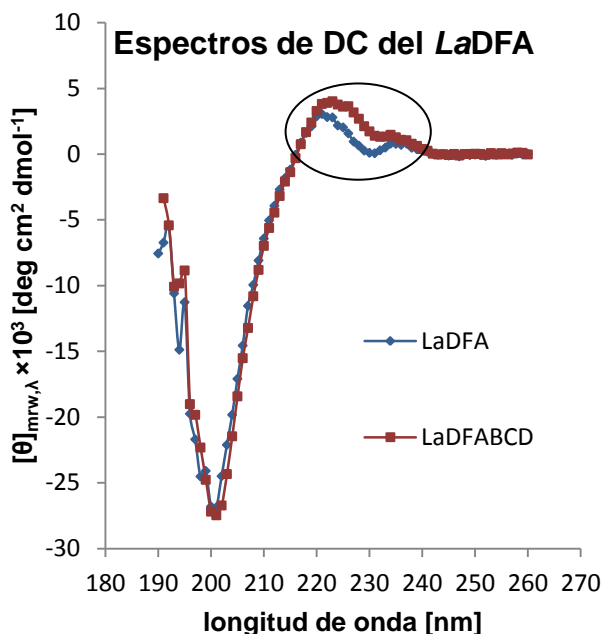


Figura 5.10 Espectro de DC del *LaDFA* en donde se muestra al *LaDFA* (-♦- azul) y al *LaDFA* con β -CD (-■- rojo) (*LaDFABCD*). Se encuentra señalada con un círculo la región que se altera tras la unión de la β -CD al *LaDFA*.

Rhizopus oryzae (*RoDFA*) está conformada por ocho hebras β antiparalelas que forman dos hojas β , y que a su vez forman una estructura de barril distorsionado. [Jiang, *et al.*, 2012]. El espectro de dicroísmo circular del *RoDFA* es semejante al del *LaDFA*, en relación a que ambos presentan una elipticidad positiva alrededor de los 230 nm, no obstante se muestra diferente en la elipticidad negativa (figura 5.10 y 5.11), el *RoDFA* tiene una elipticidad característica de una conformación de hebras β , mientras que la elipticidad negativa en el espectro del *LaDFA* está centrada en longitudes de onda menores, que pertenece más a una conformación de giros aleatorios. En la figura 5.11 se muestra que la mutación sobre los residuos aromáticos de la proteína modifica el espectro de

El cambio que se mostró en nuestros espectros indica que la unión del *LaDFA* con la β -CD ocasiona un cambio conformacional inducido por interacción de los aminoácidos aromáticos del *LaDFA* con la β -CD, los cuales se sabe interaccionan apilándose con los anillos de piranosa del sustrato (ver antecedentes).

Por otro lado, se ha visto que la estructura cristalina del *DFA* de la glucoamilasa de

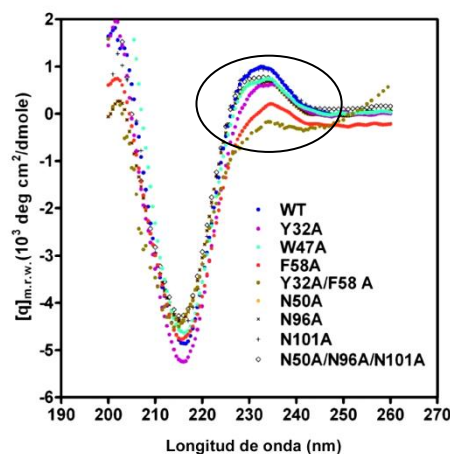


Figura 5.11. Espectro de DC del *DFA* la WT-glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* (azul) y sus mutantes, [Jiang, *et al.*, 2012]. Se encuentra señalada la región que se modifica al mutar los residuos.

dicroísmo del *RoDFA*, en la región, que como se mencionó antes, se debe a los residuos de Tyr y Trp.

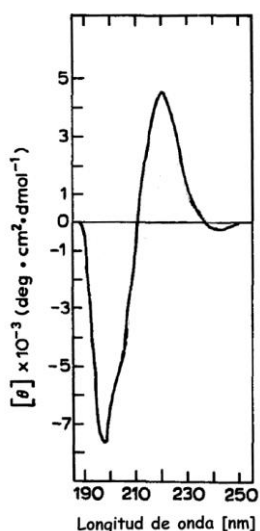


Figura 5.12. Espectro de DC de la heveína. (Rodríguez, *et al.*, 1989. Editado). Se observa un mínimo y un máximo de elipticidad semejante al del *LaDFA*

Rodríguez-Romero, *et al.*, en 1989 mostraron que la heveína presenta un espectro de DC con un máximo alrededor de los 221-223nm y uno mínimo a 198-203nm. Debido a la forma del espectro, lo consideran como una estructura irregular con presencia de giros β y asas, por lo tanto un bajo contenido de hélices y hojas β . (figura 5.12). Esta estructura fue confirmada mediante técnicas de difracción de rayos X [Rodríguez-Romero, *et al.*, 1991]. Comparando el espectro de la Heveína con el del *LaDFA*, observamos que la magnitud de elipticidad molar en la región cercana a los 200nm es mayor para la heveína que para el *LaDFA*.

Alineamiento *LaCBM26*, *RoCBM21* y *HbCBM18*

El objetivo principal del alineamiento fue encontrar que tanto se asemejan las secuencias de aminoácidos de los tres CBMs (*LaCBM26*, *RoCBM21* y *HbCBM18*)

Primero comenzaremos hablando de los residuos importantes para el reconocimiento de carbohidratos en cada uno de los CBMs. Para el *LaCBM26* los residuos Y18, Y20 y W32 están relacionados con el reconocimiento al almidón. El *HbCBM18* de la Heveína, que es un pequeño péptido, presenta tres residuos importantes para el reconocimiento de glucanos, el W21, el W23 y la Y30. [Asensio JL, *et al.*, 1995]. Mientras que el *RoCBM21* consta de dos sitios de unión a carbohidratos, con una longitud de 106 aminoácidos; en el sitio I los aminoácidos que median la interacción con el almidón son W47 y Y83, para el sitio II son N29, Y32 y E68 [Liu YN, *et al.*, 2007]

Una vez dicho lo anterior, el alineamiento de la *LaCBM26*, *HbCBM18* y *RoCBM21* se hizo por pares mediante las combinaciones posibles *LaCBM26* vs *HbCBM18*, *LaCBM26* vs *RoCBM21* y *HbCBM18* vs *RoCBM21*.

```

LaCBM26  KKVFYFEKPSSWGSRVYAYVYVYKNTNKAITSAWPGKKMTALGNDEYEL-DLDTDEDDSDLA  59
HbCBM18  -----EQCGRQAGGKLC-PNNLCCSQWGWCGSTD-----EYCSPDHNCQSNCKD--  43
          .. * :. . : * . . .* *..          ** * : :. : .*
LaCBM26  VIFTDGTKQTPAANEAGFTFTADATYDQNGVV  91
HbCBM18  -----

```

Figura 5.13. Resaltado en azul se muestran los residuos importantes para la unión de carbohidratos en el *LaCBM26*, en violeta se muestran los residuos importantes para la unión de carbohidratos en el *HbCBM18*.

El alineamiento que se realizó entre el *LaCBM26* y el *HbCBM18* muestra varios residuos conservados, pero cabe resaltar que entre las dos secuencias se alinea un triptófano relacionado con la capacidad de unir glucanos, el W32 para el *LaCBM26* y el W23 para el *HbCBM18*. Figura 5.13.

En el alineamiento del *LaCBM26* contra el *RoCBM21* se observó un alineamiento entre los residuos relacionados con la unión de carbohidratos en la *LaCBM26*, sin embargo estos residuos no está reportado que interaccionen con el azúcar en *RoCBM21* (Figura 5.14)

```

LaCBM26  KKVFYFEKPSSWGSRVYAYVYVYKNTNKAITSAWPGKKMTALGNDEYELDLDTDEDDSDLAV  60
RoCBM21  ----ASIPSSASVQLDSYNYDGST-----FSGKI-----YV---KNIAYSKKVTV  38
          . *** . :. : * * : .*          : **          *          ..          . . . : : *
LaCBM26  IFTDGTKQTPAA-----NEAGFTFTAD-----ATYDQNGV  90
RoCBM21  IYADGSDNWNNGNTIAASYSAPISGSNYEYWTFSASINGIKEFYIKEVSGKTYDNNNS  98
          * : : * : : :          *          : * : * : .          :          * : * : *
LaCBM26  V-----  91
RoCBM21  ANYQVSTS  106

```

Figura 5.14. Resaltado en azul se muestran los residuos importantes para la unión de carbohidratos en el *LaCBM26*, en amarillo se muestran los residuos importantes para el sitio I y en verde se muestran los residuos importantes en el sitio II para el *RoCBM21*.

Igual que el alineamiento anterior, entre el *RoCBM21* y *HbCBM18* no alinean residuos relacionados con el sitio de unión. Figura 5.15

```

RoCBM21 ASIPSSASVQLDSYNYDGSTFSGKIYVKNIAYSKKVTVIYADGSDNWNNGNTIAASYSYSA 60
HbCBM18 -----EQCGRQAGGKLCPPNNLCC----- 18
          : * .** : :*.
RoCBM21 PISGSNYEYWTFSASINGIKEFYIKEVSGKTYDNNNSANYQVSTS 106
HbCBM18 -----SQWGWCGSTDE---YCSPDHNC-----QSNCKD--- 43
          . * :..* : : : . .:* :

```

Figura 5.15. Resaltado en violeta se muestran los residuos importantes para la unión de carbohidratos en el *HbCBM18*, en amarillo se muestran los residuos importantes para el sitio I y en verde se muestran los residuos importantes en el sitio II para el *RoCBM21*.

La identidad entre las proteínas es pobre, ya que los tres alineamientos realizados muestran 8.7% de identidad para *LaCBM26* vs *HbCBM18*, 15.6% para *LaCBM26* vs *RoCBM21* y 6.6% para *HbCBM18* vs *RoCBM21*. A pesar de lo cual los dominios de fijación a carbohidratos muestran un comportamiento semejante al analizar los cambios conformacionales en el dicroísmo.

Proteólisis del *LaDFA*.

Dada la aparente inestabilidad mostrada por el *LaDFA* durante la purificación, la integridad de la proteína se monitoreo después de una y tres semanas de almacenamiento a 4°C en amortiguador fosfatos 20mM pH 7.6. Al transcurrir la primera semana se observó la ruptura del DFA, la cual por estimación del peso de los fragmentos obtenidos parece darse en los módulos que lo constituyen (Figura 5.9).

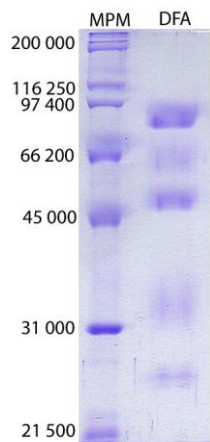


Figura 5.16a *LaDFA* una semana después de la purificación

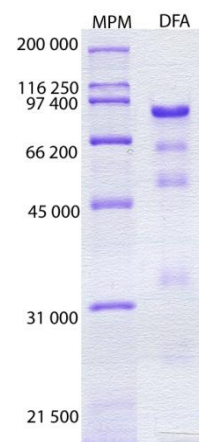


Figura 5.16b. *LaDFA* tres semanas después de la purificación

En las figuras 5.16 a y b se observa que reaparecen las bandas que eliminamos mediante el proceso de purificación. Lo cual nos indica que nuestra proteína

puede tener alguna actividad proteolítica sobre sí misma o por una proteasa asociada. Esta misma degradación se observó con la α -amilasa completa e inclusive en otras construcciones. La naturaleza de la inestabilidad queda para investigarse posteriormente.

VI. Conclusiones

Los datos experimentales observados en la isoterma de unión *LaDFA*- β -ciclodextrina se ajustan mejor al modelo de 5 sitios secuenciales.

El análisis de los resultados obtenidos con el modelo de 5 sitios secuenciales, reveló que tres de los cinco CBM del *LaDFA* se rigen por las generalidades termodinámicas encontradas en otros módulos, es decir, favorecidos entálpicamente y desfavorecidos entrópicamente; además, estos módulos tienen una K_a mayor a la reportada para otros CBM. En contraste, los otros dos CBM son gobernados de forma opuesta, desfavorecidos entálpicamente y favorecidos entrópicamente; estos presentan una K_a de magnitud semejante a la reportada para otros CBM, indicándonos que tal vez alguno de estos módulos sea el primero en ocuparse con la β -CD, y tras la subsecuente unión de la β -CD a los demás sitios se provoque un cambio conformacional en el *LaDFA*.

Con fines comparativos la isoterma de unión del *LaDFA*- β -ciclodextrina se ajustó al modelo de un sitio de unión, observándose que la K_a obtenida (2.29×10^6) es casi 40 veces superior a la de un solo módulo del *LaDFA* (5.85×10^4), lo que sugiere un efecto sinérgico entre los 5 módulos presentes.

Mediante los experimentos de dicroísmo circular se corroboró que existe un cambio conformacional sobre el *LaDFA*. Este cambio se ve reflejado en la región del espectro de UV lejano que corresponde a los aminoácidos aromáticos, y que se observa como un corrimiento hacia longitudes de onda mayores en el espectro del *LaDFA* con β -CD respecto al espectro sin β -CD.

VII. Referencias

Asensio JL, Canada FJ, Bruix M, Rodriguez-Romero A, Jiménez-Barbero J (1995). The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. *Europe Journal of Biochemistry*. 230:621 -633:

Belitz D, Grosch W (1997). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Zaragoza: Acribia. 337-348.

Belshaw N, Williamson G (1993). Specificity of the binding domain of glucoamylase 1. *European Journal of Biochemistry*. 211:717-724.

Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté. 25-35.

Bergthaller W, Hollmann J (2007). Starch, Ed. Kamerling J, *Comprehensive Glycoscience*, Volumen 2, Alemania, 579-612.

Boraston A, Bolam D, Gilbert H, Davies G (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition, *Biochemical Journal*., 15; 382:769–781.

Boraston A, Ghaffari M, Warren RA, Kilburn DG (2002). Identification and glucan-binding properties of a new carbohydrate-binding module family. *Biochemical Journal*, 361:35-40.

Boraston A, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, Lammerts A, Law V (2006). A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 y 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 281:587-598.

Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S (1998). Starch granules: structure and biosynthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23:85-112.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. ***Nucleic Acids Research***. 37:D233-D238.

DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

FAO (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nation. Recuperado el 22 de abril del 2014 de <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-143.pdf>.

Freyer MW, Lewis EA (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology*, 84:79-113.

Gallagher S (2012). One dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*. 10.2A.1-10.2A.44.

Gidley, MJ (2001). Starch structure / function relationships: achievements and challenges, ed. Barsby TL, Donald AM, Frazier PJ. *Advances in structure and function*, Reino Unido: Royal Society of Chemistry. 1-7.

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

Guillén D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2007). Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:3833–3837.

Harding SE, Chowdhry BZ (2001). Protein-ligand interactions: Hydrodynamics and Calorimetry: A Practical Approach. Nueva York: Oxford University Press, 1-17.

Jane JL (2009). Starch, ed. BeMiller J, Wistler R, Starch. *Chemistry and Technology*. Tercera edición. USA: Elsevier, 193-236.

Janeček S (1992). New conserved amino acid region of α -amylases in the third loop of their $(\beta/\alpha)_8$ -barrel domains. *Biochemical Journal*, 288:1069-1070.

Janeček S (1994). Parallel β/α -barrels of α -amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of β -amylase: evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences, *FEBS Letters*, 353: 119-123.

Janeček S (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal alpha-amylases. *European Journal Biochemistry*, 224:519-524.

Janeček S (1995). Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *FEBS Letter*, 377:6-8.

Janeček Š (2009). Amylolytic enzymes- Focus on the alpha-amylases from archaea and plants. *Nova Biotechnologica*, 9:5-25.

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

Jiang TY, Ci YP, Chow W, Lee YC, Sun YJ, Chou WY, Li KM, Chang MDT. (2012). Two Unique Ligand-Binding Clamps of *Rhizopus oryzae* Starch Binding Domain for Helical Structure Disruption of Amylose. *PLoS ONE*, 7:0041131.

Kadziola A., Abe J, Svensson B, Haser R (1994). Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *Journal of Molecular Biology*, 239:104-121.

Kelly S, Jess T, Price N (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1751:119-39.

Ladbury J, Doyle M (2004). *Biocalorimetry 2: Application of Calorimetry in the Biological Science*. John Willey & Sons, Ltd, Inglaterra, 35-58.

Lewis E, Murphy K (2005). Isothermal Titration Calorimetry. Ed Nienhaus G. Methods in Molecular Biology, vol. 305: Protein–Ligand Interactions: Methods and Applications. Humana Press Inc., Totowa, 1-15.

Linder M, Salovuori I, L. Ruohonen, Teeri T (1996). Characterization of a double cellulose binding domain. Journal of Biological Chemistry. 271:21268–21272.

Liu YN, Lai YT, Chou WI, Chang MDT, Lyu PC (2007). Solution structure of family 21 carbohydrate-binding module from *Rhizopus oryzae* glucoamylase. Biochemical Journal, 403:21-30.

MacGregor A, Janeček S, Svensson B (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. Biochimica et Biophysica Acta, 1546:1-20.

Machovič M, Janeček Š (2006) The evolution of putative starch-binding domains. FEBS Letters, 580:6349-6356.

Machovic M, Svensson B, MacGregor EA & Janeček Š (2005). A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. FEBS Journal. 272:5497-5513.

Matsuura Y, Kusunoki M, Date W, Harada S, Bando S, Tanaka N, Kakudo M (1979). Low resolution crystal structures of taka-amylase A and its complexes with inhibitors. The Journal of Biochemistry, 86:1773-1783.

Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, Kakudo M (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. The Journal of Biochemistry, 95:697-702.

Megazyme 6³- α -D-Glucosyl-maltotriose. Recuperado el 22 de abril del 2014 de <http://secure.megazyme.com/63-Alpha-D-Glucosyl-maltotriose>.

Megazyme 6³- α -D-maltotriosyl-maltotriose. Recuperado el 22 de abril del 2014 de http://secure.megazyme.com/63_Alpha-D-Glucosyl_maltotriosyl_maltriose.

Morales, FJ. Estudio de titulación isotérmica sobre el reconocimiento molecular de la β -ciclodextrina y un dominio de unión al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Mukerjea R, Mukerjea R, Robyt JF (2009) Starch biosynthesis: experiments on how starch granules grow *in vivo*. Carbohydrate Research, 344:67-73.

Nakajima R, Imanaka T, Aiba S (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amilases. Applied Microbiology and Biotechnology, 23:355-360.

Nelson LD, Cox MM (2013). Lehninger. Principles of Biochemistry. Sexta edición. Nueva York: Macmillan Higher Education. 259.

Oostergetel GT, van Bruggen EFJ (1989). On the origin of a low angle spacing in starch. Staërke, 41:331-335.

Oostergetel GT, van Bruggen EFJ (1993). The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. Carbohydrate Polymers, 21:7-12.

Peat S, Whelan WJ, Thomas GJ (1952). Evidence of multiple branching in waxy maize starch. Journal of Chemical Society Chemical Communications, 4546-4548.

Pilling and Smith (2011). Physical Aspects of the Digestion of Carbohydrate Particles. Ed Springer. Lentle R, Janssen P. The Physical Processes of Digestion, 31-46.

Reymond J, (2006). Enzyme assays: high-throughput screening, genetic selection, and fingerprinting. Weinheim: Wiley-VCH. 1-14.

Robyt F (2009). Starch, ed. BeMiller J, Wistler R, Starch. Chemistry and Technology. Tercera edición. USA: Elsevier. 237-292.

Rodríguez- Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot JP (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*, 66:3350-3356.

Rodríguez-Romero A, Arreguín B, Hernandez-Arana A. (1989). Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 998: 21-24.

Rodríguez-Romero A, Ravichandran KG, Soriano-Garcia M (1991). Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Letters* 291:307-309.

Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sánchez S (2009). A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36:341–346.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Santiago M, Linares L, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R (2005). Functional Characteristics of the *Lactobacillus amylovorus* α -amylase starch binding domain. *Biología*, 60:111-114.

Sigurskjold W, Svensson B, Williamson G, Driguez, H, (1994). Thermodynamics of ligand binding to the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*. 225:133-141.

Southall S, Simpson P, Gilbert H, Williamson G, Williamson M (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch, *FEBS Letters*, 447:58-60.

Spencer J, Bodner G, Rickard L (2000). Química. Estructura y dinámica. México: CECSA. 617-651.

Svensson B, (1994). Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology*. 25:141-157.

Tomme P, Creagh AL, Kilburn DG, Haynes CA (1996). Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry*. 35:13885-94.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of National Academics Science*, 76:4350–4354.

van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*. 94:137-55.

Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E, (2004) Isothermal Titration Calorimetry, *Current Protocols in Cell Biology*, 23:17.8.1-17.8.24.

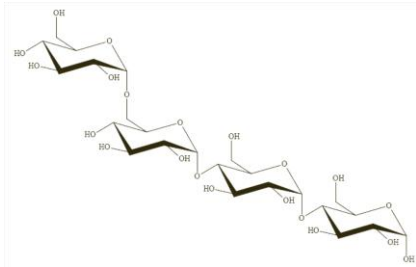
Voet D, (2007). Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 15.

Wiseman T, Williston S, Brandts J, Lin L, (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179:131-137.

Woody R (1994). Circular Dichroism of peptides and proteins. Ed Nakanishi K, Berova N, Woody R. *Circular Dichroism Principles and applications*. VCH, 173-196.

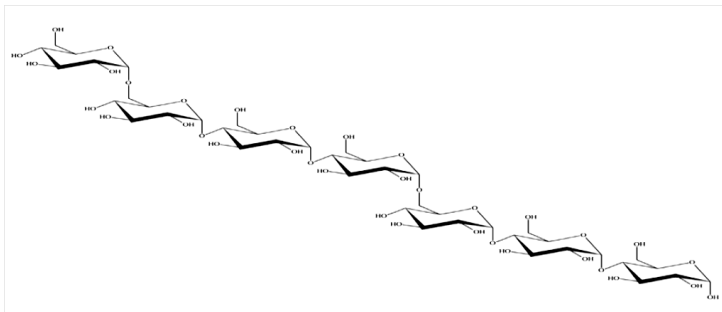
Apéndice I. Azúcares

GM3



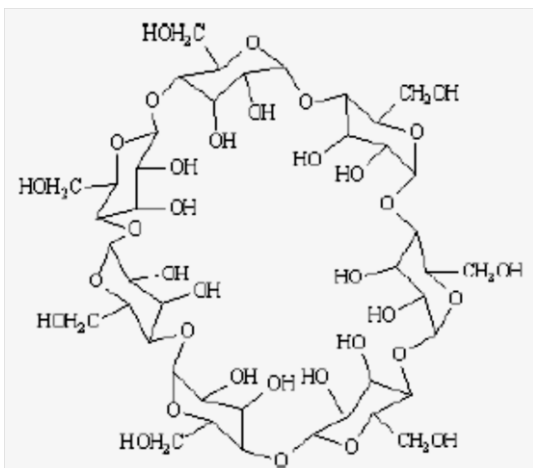
Sinónimo: (6³-α-D-glucosil-maltotriosa)
Preparado por digestión enzimática controlada del pululano [Megazyme 6³-α-D-Glucosyl-maltotriose]

GM3M3



Sinónimo: 6³-α-D-glucosil-maltotriosil-maltotriosa
Preparado por digestión enzimática controlada del pululano [Megazyme 6³-α-D-maltotriosyl-maltotriose]

β-ciclodextrina



Sinónimos:

Beta-ciclodextrina, βCD, BCD, Dextrina β-Schardinger, Ciclodextrina B.

Sacárido cíclico no reductor, consistente de siete unidades de alfa-1,4-D-glucopiranosidos, generado por la acción de la ciclodextrin transglicolasa durante la hidrólisis del almidón

[FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006]

Apéndice II. Disoluciones y Medios

Medio LB (Luria-Bertani) por litro [Sambrook, *et al.*, 1989]

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
NaOH	1mL

El pH es cercano a 7

Calorimetría y Dicroísmo Circular

Tampón fosfatos 20mM pH 7.6

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.5267g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.4291g/L
Ajustar el pH con ácido fosfórico	

Tampón fosfatos 10mM pH 7.6

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2633g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.2146g/L
Ajustar el pH con ácido fosfórico	

Purificación con columna de Níquel

Tampón de unión (Tampón fosfatos 20mM pH 7.6, 25mM Imidazol, 0.5M NaCl)

Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	4.5267g/L
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.4291g/L
Imidazol	1.702g/L
NaCl	29.02g/L
Ajustar el pH con ácido fosfórico	

Tampón de elución (Tampón fosfatos 20mM pH 7.6, 500mM Imidazol, 0.5M NaCl)

Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	4.5267g/L
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.4291g/L
Imidazol	34.04g/L
NaCl	29.02g/L
Ajustar el pH con ácido fosfórico	

Geles SDS [Gallagher, 2012]

Tampón de migración

Tris base	15g/L
Glicina	72g/L
SDS	5g/L

Tampón 4x para cargar muestras

Agua destilada	8.0mL
Tris HCl 0.5M pH 6.8	2.5mL
Glicerol	2mL
SDS 10%	4mL

β -Mercaptoetanol	1mL
Azul de bromofenol 0.5%	1mL

Tampón para gel separador Tris HCl pH8.8

Tris base	182g
Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N. Aforar a 500mL	

Tampón para gel concentrador Tris HCl pH6.8

Tris base	6.05g
Ajustar a pH 6.8 con HCl 1N. Aforar a 100mL	

Western blot

Tampón de Transferencia 10x

Glicina	144g/L
Tris base	30 g/L

Tampón de inmunolocalización. PBS 10X

KH ₂ PO ₄ (1.4 mM)	0.24 g/L
Na ₂ HPO ₄ (0.01 M)	1.44 g/L
NaCl (0.137 M)	8.00 g/L
KCl (2.7 mM)	0.20 g/L
Agregar agua destilada hasta 800 mL. Ajustar el pH a pH 7.4 con 1 M HCl y aforar a 1 L	

Apéndice III. Métodos

Geles de poliacrilamida [Gallagher, 2012]

Reactivo	Gel de concentración 4%	Gel de separación 10%
Agua destilada	2.42mL	4mL
Tris HCl 0.5M, pH 6.8	1mL	---
Tris HCl 0.5M, pH 8.8	---	2.5mL
Acrilamida	532µL	3.32mL
SDS 10%	40µL	100µL
Persulfato de amonio 10%	22µL	55µL
Temed	4.4µL	5.5µL

Es importante destacar que el persulfato de amonio 10% y el Temed se agregan justo antes de vaciar la disolución en las placas.

Preparación de geles

Ensamblar placas de vidrio evitando fugas

Agregar el gel de separación a la concentración deseada, 3.45mL

Para nivelar la parte superior del gel se puede agregar un poco de etanol

Tras haber polimerizado el gel se retira el etanol

Vaciar el gel de concentración y colocar el peine

Precorrer los geles 15 minutos a 20mA en tampón de migración, posteriormente se pueden colocar las muestras

Preparación de las muestras

Colocar las muestras con tampón de muestra a una concentración final de 1X, hervirlas a 95°C durante 5 minutos y colocarlas en hielo. Centrifugar levemente para recuperar el agua condensada.

Tinción de geles

Soluciones para revelar los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie:

Fijación	Etanol	40%	30 minutos
	Acido acético glacial	10%	
Tinción	Stock I	50%	20 minutos
	Stock II	50%	
Desteñir	Solución de fijación		30-60 segundos
	Etanol	20%	Hasta lograr la decoloración del fondo
	Acido acético glacial	10%	

Stock I	0.2% azul de coomassie
	90% etanol
Stock II	20% acido acético

Cuantificación de azúcares totales (β -ciclodextrina) [DuBois, et al., 1956]

Fenol sulfúrico en tubos y placa de 96 pozos

Reactivos

Solución A. Solución acuosa de fenol (C_6H_5OH) a 50 g/l. Esta solución deberá conservarse a 4°C y puede ser utilizada mientras no presente un color marrón.

Solución B. Ácido sulfúrico concentrado.

Procedimiento

	Tubo	Tubo	Placa	
Colocar	1mL	200 μ l	14 μ L	de muestra a un tubo de ensayo
Agregar	1mL	200 μ l	14 μ L	de la solución de fenol, tapar y agitar en el vórtex
Agregar	5mL	1 ml	70 μ L	de ácido sulfúrico con precaución porque se presenta una reacción exotérmica

Curva de β -CD y glucosa

μ g/mL	Volumen de stock [100 μ g/mL]	Amortiguador
0	0	14
20	2.8	11.2
40	5.6	8.4
60	8.4	5.6
80	11.2	2.8
100	14	0

Tapar y agitar nuevamente en vórtex, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Leer la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro

Ajustar a cero la absorbancia con un blanco de agua tratado bajo el mismo procedimiento

Cuantificación de proteína por DC Protein Assay de biorad

1. Preparar 3-5 diluciones de un estándar de proteína [4mg/mL]. Conteniendo de 0.2mg/mL a 1.5mg/mL de proteína. La curva estándar debe de ser preparada cada vez que se lleve a cabo el ensayo. Los mejores resultados se dan si los estándares siempre son preparados en el mismo amortiguador de muestra.
2. Pipetear 20µL de estándar y muestras dentro de tubos limpios y secos
3. Agregar 100µL del reactivo A en cada tubo de prueba. Agitar.
4. Agregar 800µL del reactivo B en cada tubo de prueba y agitar inmediatamente.
5. Después de 15 minutos las absorbancias pueden ser medidas a 750nm. Las absorbancias serán estables a la hora.

Curva de BSA

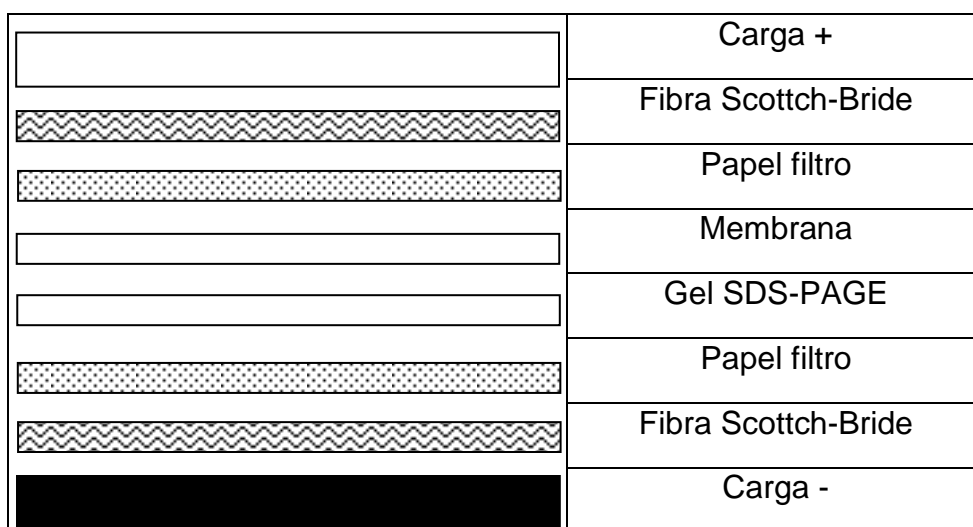
BSA [mg/mL]	µL de stock [4mg/mL BSA]	µL amortiguador de fosfatos pH 7.6
0	0	20
0.04	0.2	19.8
0.1	0.5	19.5
0.2	1	19
0.4	2	18
0.6	3	17
0.8	4	16
1	5	15

Western blot

En el western blot las proteínas son transferidas de una membrana a partir de un gel de acrilamida (SDS-PAGE) posterior a la separación por peso molecular. La técnica nos permite la localización de de la proteína mediante la inmunolocalización con anti His y confirmar la presencia de productos de degradación.

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100mL del amortiguador de transferencia 10X con 100mL y se afora a 1L
2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con amortiguador de transferencia.
3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma



4. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque de transferencia, el ensamble se debe cubrir totalmente con amortiguador de transferencia
5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5h. Para evitar que aumente la temperatura se debe de hacer en el cuarto frío o enfriar con hielo el tanque.

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, 1h a 37°C o se puede almacenar por unos días

Reconocimiento de las Histidinas

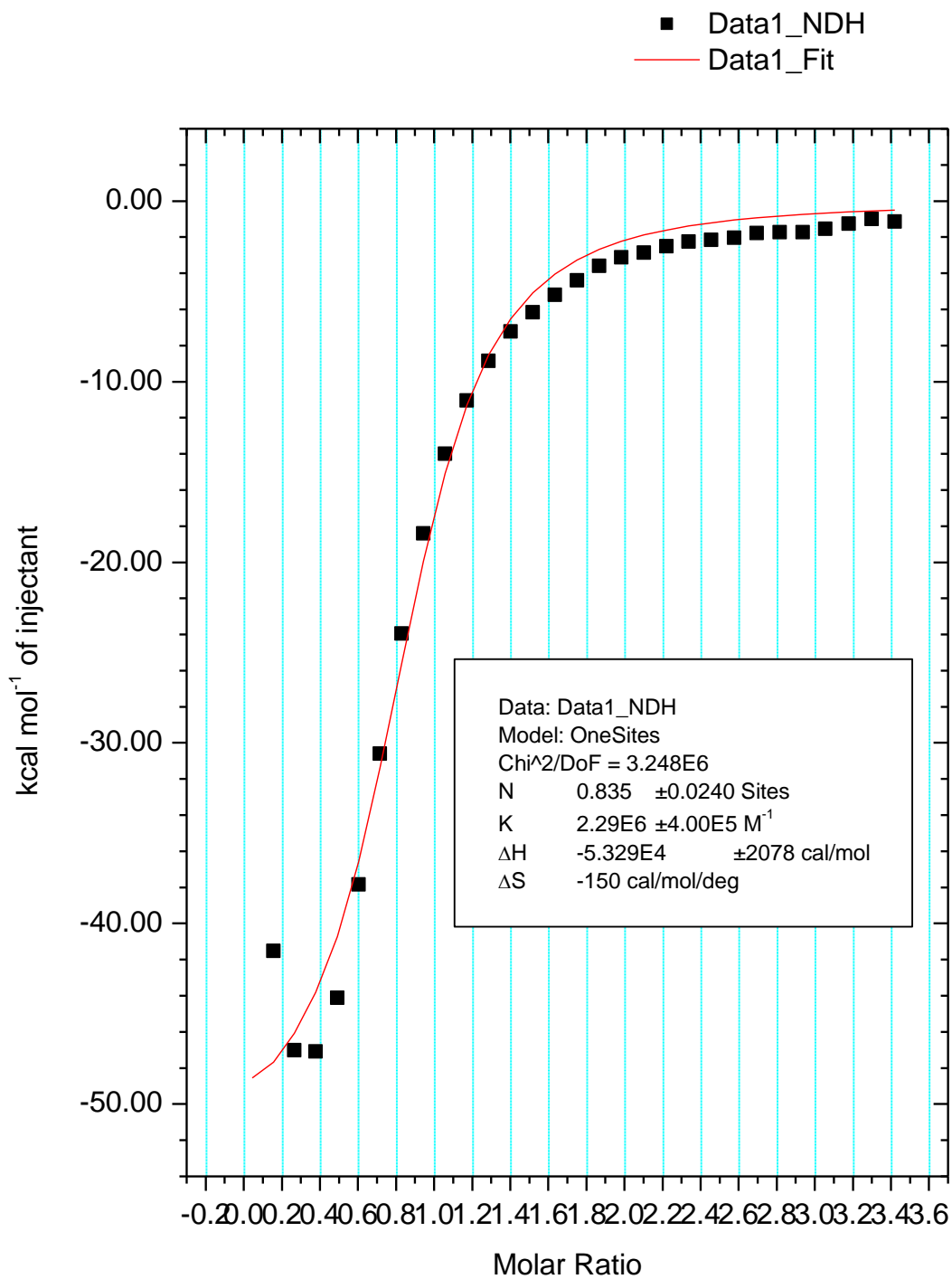
1. Se prepara la solución amortiguadora PBS 1X, Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 3%.
2. Se adiciona el volumen necesario del stock de anti-Histidinas para tener una concentración final de 0.2µg/mL en el volumen necesario para cubrir la membrana con de la solución amortiguadora anterior. Se incuba a 15-20°C 1-1.5 horas con agitación ligera.
3. La membrana se lava por 5 minutos con 20mL de tampón PBSx/Tween 20 0.05% 3 veces
4. El segundo anticuerpo, anti-IgG, se prepara de la misma forma que el primero, quedando a una concentración final 0.2µg/mL. Se repiten los pasos 2 y 3.

Revelado

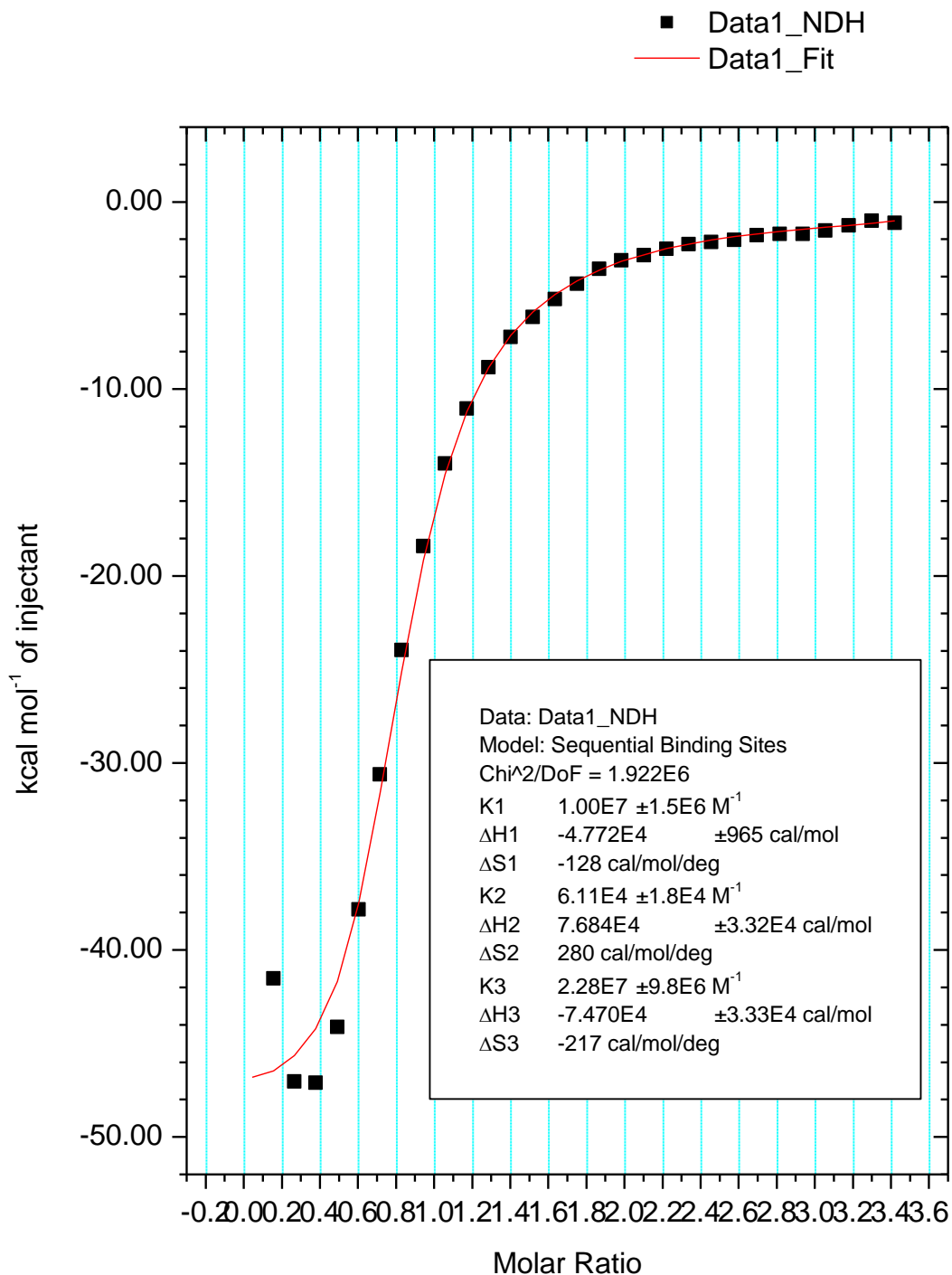
1. El revelado se hace con la actividad de la fosfatasa alcalina, que ahora se encuentra acomplejada al segundo anticuerpo
2. Se agrega 10mL de BCIP/NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina, (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21g/L y nitroazul de tetrazolio a una concentración de 0.42g/L en una base orgánica/ amortiguador Tris) al 80%, y se incuba hasta que sean visibles las bandas.
3. La reacción se detiene cambiando el medio con sustrato por agua destilada.

Apéndice IV. Ajustes ITC

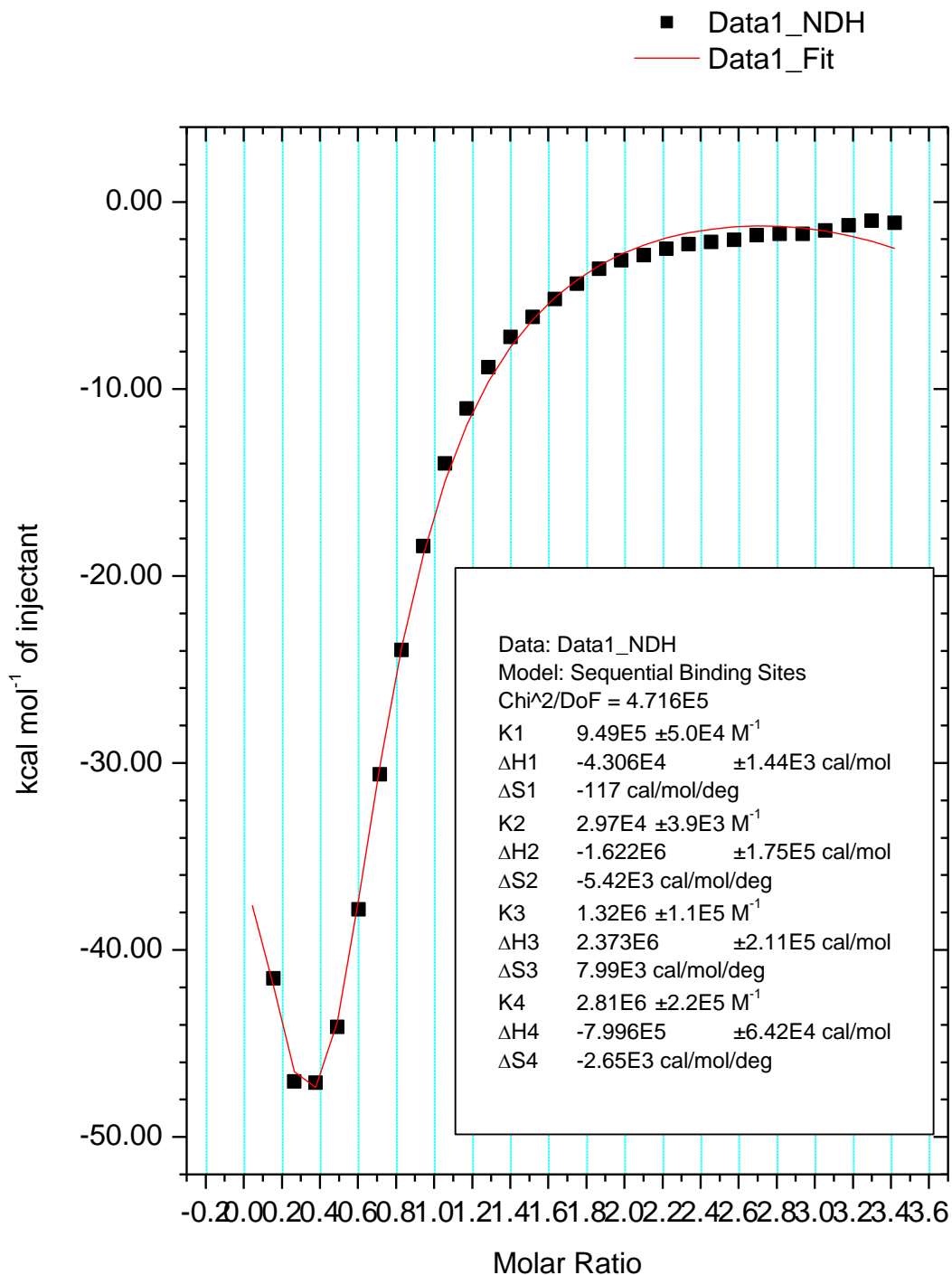
Ajuste de 03092012 para 1 sitio



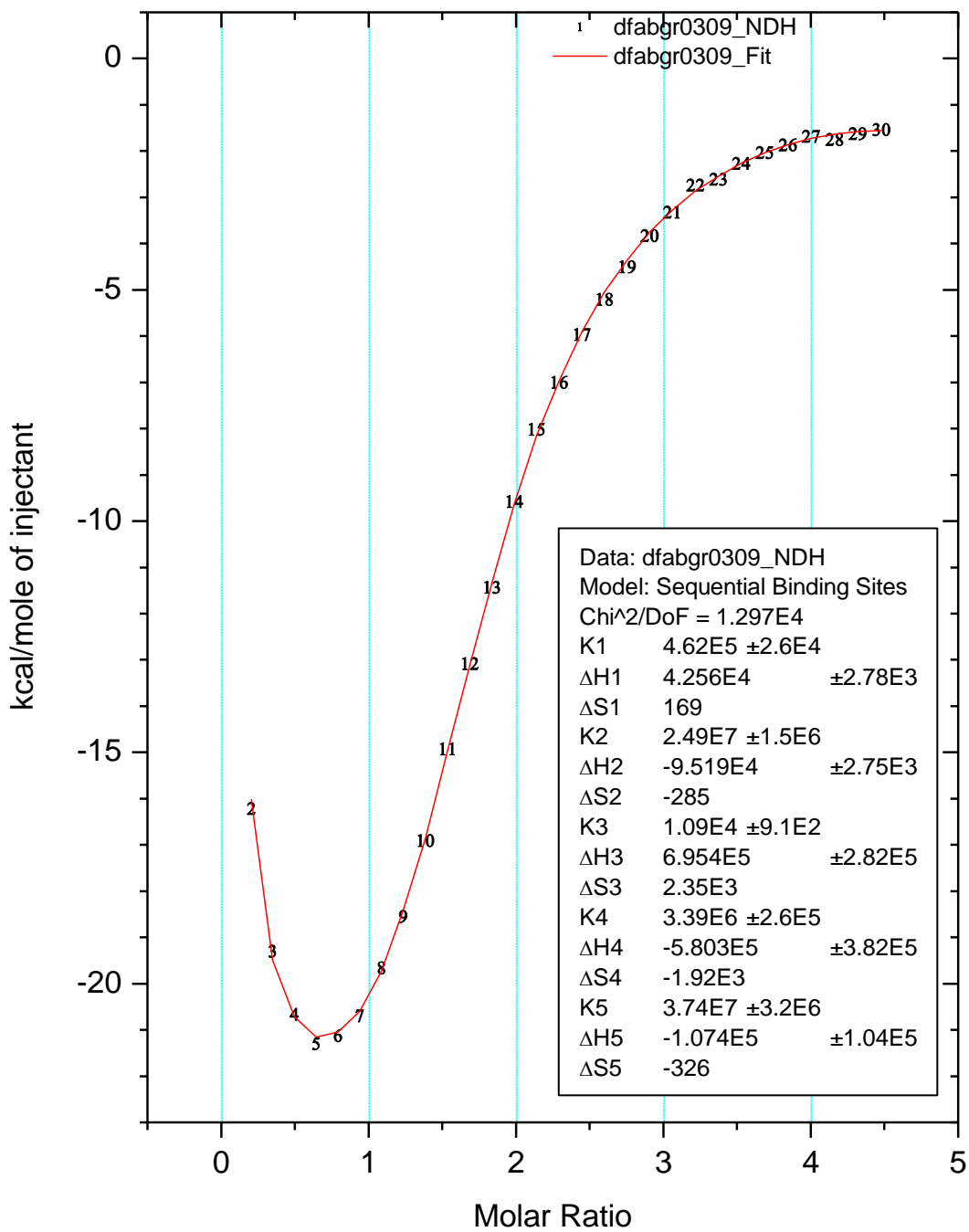
Ajuste de 03092012 para 3 sitios de unión secuenciales



Ajuste de 03092012 para 4 sitios de unión secuenciales



Ajuste de 03092012 para 5 sitios de unión secuenciales



Apéndice V. Aspectos técnicos del ITC

En toda reacción química, ocurre un reacomodo estructural debido a la formación o ruptura de enlaces débiles tipo puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, etc, lo cual libera o absorbe calor [Spencer, *et al.*, 2000]. El calor absorbido o liberado durante la reacción es medido a través de un calorímetro, el cual nos da una descripción termodinámica completa. En aplicaciones biológicas se puede medir directamente la energía de interacción entre dos moléculas, como la interacción proteína-ligando, proteína-lípido, proteína-proteína, ADN-proteína, proteína-carbohidrato, y antígeno-anticuerpo. (Velázquez-Campoy, *et al.*, 2004). La técnica capaz de brindarnos la descripción termodinámica es el ITC. Esta técnica permite determinar la entalpía (ΔH°), entropía (ΔS°), así como la estequiometría asociada a la unión (n), y la constante de unión (Wiseman 1989) y teniendo estos valores es fácil determinar la energía libre de Gibbs (ΔG°),

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

O

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_a$$

Los componentes esenciales de un equipo de ITC son un par de celdas alineadas, una de muestra y otra de referencia, rodeadas por un termostato para compensar (y medir) el calor liberado en la celda de muestra manteniendo la temperatura igual a la de la celda de referencia. Las celdas se encuentran aisladas del medio por una chaqueta adiabática. El sistema inyector consta de una jeringa con una larga aguja y un agitador integrado en la aguja.

El instrumento de ITC opera como un calorímetro de flujo de calor, en el que se compensa la pérdida de calor, es decir, mide la cantidad de energía necesaria para mantener la diferencia de temperatura entre la celda de muestra y la celda de referencia.

Las señales que provee el calorímetro de ITC dependen de las concentraciones de macromolécula [M], y de ligando [L], el volumen de la celda, el volumen

inyectado y los valores de K , ΔH y n . El instrumento durante el ensayo experimental da una isoterma para obtener la K , por lo que es necesario hacer el ensayo bajo condiciones que permitan detectar el calor producido o absorbido durante cada titulación.

El estudio de las interacciones entre proteína-ligando [Lewis y Murphy, 2005] las describen en siete etapas para realizar el estudio termodinámico.

1. Planear el experimento.
2. Preparar las disoluciones L y M.
3. Colectar los datos experimentales.
4. Colectar los blancos.
5. Corregir los datos experimentales.
6. Hacer la regresión no lineal de los datos de la titulación corregida para obtener los valores de los parámetros termodinámicos estimados.
7. Interpretar los datos del modelo.

Etapa 1. Planear el experimento

En esta etapa se determina la concentración necesaria de ligando y proteína a utilizar, ya que la forma de la curva obtenida dependerá de la concentración. Las concentraciones de ligando y proteína normalmente se encuentran en el rango de micromol, sin embargo, pueden ser menores dependiendo de la sensibilidad del instrumento. Wiseman, *et al.*, (1989) mencionan que existen dos parámetros importantes cuando se compara la sensibilidad de los calorímetros. Uno es el límite de detección absoluta S con unidades μcal , el cual es proporcional a la masa mínima total de macromolécula necesaria para producir una señal detectable, mientras que la sensibilidad del volumen normalizado S/V ($\mu\text{cal/mL}$) es proporcional a la concentración mínima de soluto necesario para producir una señal detectable. Por lo que entre más pequeña sea la concentración de la macromolécula usada, más grande será la constante de unión que puede ser medida.

La forma de la isoterma también se ve afectada por la afinidad de la interacción. A través de una constante dimensional, c , se puede generar isoterma simuladas para cualquier valor del parámetro seleccionado, esta constante se encuentra definida como el producto de la constante afinidad de la unión por la concentración total de la macromolécula (Wiseman, *et al.*, 1989).

$$c = M_{total}K_a$$

Para uniones fuertes ($c=\infty$), todo el ligando es unido hasta la saturación, resultando en una isoterma de forma rectangular, carente de puntos en la región

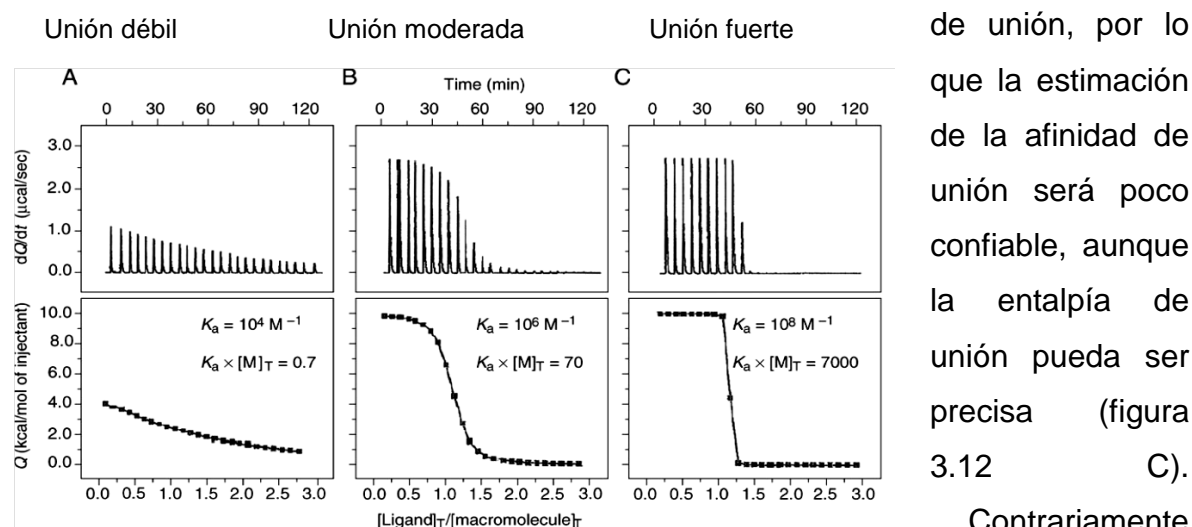


Figura 3.12 A) unión débil con un valor $c=0.1$ B) unión moderada para con un valor de c entre 1 y 1000 C) uniones fuertes para valores c que tienden hacia el infinito.

una forma sin rasgos distintivos, haciendo poco fiable la entalpía y la afinidad de la unión obtenida (figura 3.12A). Para una unión moderada ($1 < c < 1000$) la forma de la isoterma es bastante sensible a los cambios en los valores de concentración de la macromolécula. La ordenada al origen no será el exactamente igual a la entalpía pero puede ser obtenida mediante convolución del área total bajo la curva (figura 3.12B).

de unión, por lo que la estimación de la afinidad de unión será poco confiable, aunque la entalpía de unión pueda ser precisa (figura 3.12 C).

Contrariamente para uniones débiles ($c=0.1$) la isoterma tomará

El valor de c , para una afinidad constante, puede ser modificado cambiando la concentración de la macromolécula total, M_{total} .

Por otra parte, es necesario definir el número de inyecciones a realizarse, el volumen inyectado y los intervalos entre cada inyección.

Etapa 2. Preparar disoluciones de L y M.

Las disoluciones deben de ser preparadas con la mayor exactitud posible. Se pueden preparar mediante la dilución de disoluciones stock o disolviendo una masa conocida, en un volumen definido; sin embargo, es importante corroborar la concentración mediante algunos procedimientos analíticos como absorbancia, actividad cinética, entre otros. La importancia de conocer la concentración precisa del ligando recae sobre los errores que pueden afectar directamente a los valores de K y ΔH . También es importante que la composición del disolvente en la celda de muestra, en la celda de referencia y en el inyector se prepare bajo condiciones idénticas de pH, tipo de amortiguador, concentración de sales, etc.

Etapa 3. Obtener los datos crudos.

Se realiza el ensayo bajo las condiciones establecidas, con las concentraciones determinadas, el número de inyecciones, volúmenes y tiempos.

Etapa 4. Determinar los blancos

Una vez que se realiza el ensayo, se procede con la cuarta etapa, la cual nos servirá para la corrección de los datos obtenidos durante el ensayo. En esta etapa se mide el calor producido durante la dilución del ligando en el amortiguador, el calor de la proteína durante la dilución y el calor producido por el amortiguador en el amortiguador (calor del instrumento). Los blancos se miden bajo las mismas condiciones del ensayo. Los volúmenes inyectados deben de ser iguales y

Etapa 5. Corregir los datos experimentales

La cuarta etapa es resumida en la siguiente ecuación

$$Q_{\text{corregido}} = Q_{\text{medido}} - Q_{\text{dilución del ligando}} - Q_{\text{dilución de la macromolécula}} + Q_{\text{instrumento}}$$

Es importante destacar que las correcciones se deben realizar de acuerdo con los volúmenes inyectados durante el ensayo de la macromolécula.

También se debe de conocer el número de protones liberados y el calor de ionización del amortiguador. Por lo que la entalpía obtenida durante el ensayo está dada por:

$$\Delta H_{\text{medida}} = \Delta H_0 - \Delta H_{\text{ion}} \times n_p$$

donde ΔH_0 es la entalpía de la unión en ausencia del calor de los protones del amortiguador, ΔH_{ion} es el calor de los protones ionizados en el amortiguador y n_p es el número de protones liberados durante la ionización de una mol de ligando. Este valor se determina mediante la medición en por lo menos dos amortiguadores con calores de ionización diferentes.

Además las disoluciones deben de ser degasificadas para evitar la formación de burbujas y obtener señales falsas de calor. (buscar efecto de las burbujas en el microcalorimetro).

Etapa 6. Análisis de datos

Hay muchos modelos algorítmicos disponibles para el análisis de datos pero todos generan casi la misma respuesta, los modelos de ajuste se encuentran en el software suministrado por el proveedor o de manera comercial. (Freyer & Lewis, 2008)

El calor integrado para cada inyección en un ensayo de ITC es la diferencia en el contenido de calor antes y después de la inyección.

A continuación se muestran los modelos provistos por el fabricante, donde

K= constante de unión	V_0 = Volumen de la celda
n = numero de sitios	Θ = fracción de sitios ocupados
M_f y $[M]$ =la concentración de la proteína libre en V_0 y a lo largo de la titulación	X_f y $[X]$ = la concentración del ligando libre y a lo largo de la titulación

Un sitio

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0$$

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right]$$

Sitios independientes

Ejemplo: 2 sitios independientes

$$Q = M_t V_0 (n_1 \Theta_1 \Delta H_1 + n_2 \Theta_2 \Delta H_2)$$

Sitios secuenciales

$$F_0 = \frac{1}{P}$$

$$F_1 = \frac{K_1[X]}{P}$$

$$F_2 = \frac{K_1 K_2 [X]^2}{P}$$

$$F_n = \frac{K_1 K_2 \dots K_n [X]^n}{P}$$

$$P = 1 + K_1[X] + K_1 K_2 [X]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [X]^n$$

$$X_t = [X] + M_t \sum_{i=1}^n i F_i$$

$$Q = M_t V_0 (F_1 \Delta H_1 + F_2 [\Delta H_1 + \Delta H_2] + \dots + F_n [\Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3 + \dots + \Delta H_n])$$

Etapa 7. Interpretar los datos del modelo

Esta etapa se hace en función de los ensayos que se planearon para llevar a cabo la calorimetría.

Apéndice VI. Dicroísmo Circular

Kelly, *et al.*, 2005, Para el CD lejano de proteínas, las unidades repetidas son el enlace peptídico. El peso medio de residuos, MRW (por sus siglas en inglés Mean Residue Weight), para el enlace peptídico es calculado de

$$MRW = \frac{M}{N-1}$$

Donde M es el peso molecular de la cadena polipeptídica (en Da), y N es el número de aminoácidos en la cadena, el número de enlaces peptídicos es N-1. Para la mayoría de las proteínas el valor MRW es 110±5 Da

La elipticidad media del residuo a la longitud de onda λ ($[\theta]_{mrw, \lambda}$) está dado por

$$[\theta]_{mrw, \lambda} = \frac{MRW \times \theta_{\lambda}}{10 \times d \times c}$$

Donde θ_{λ} es la elipticidad molar observada (en grados) a la longitud de onda λ , d es el paso de la celda y c la concentración en (g/mL)

Si nosotros conocemos la concentración molar (m) del soluto, la elipticidad molar a la longitud de onda λ ($[\theta]_{molar, \lambda}$) está dada por

$$[\theta]_{molar, \lambda} = \frac{100 \times \theta_{\lambda}}{m \times d}$$

Donde θ_{λ} es la elipticidad molar observada (en grados) a la longitud de onda λ y d es el paso de la celda. Las unidades de la elipticidad media de residuo y la elipticidad molar son $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$