



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Estudio funcional de tres módulos de unión al almidón del SBD de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIÓL. ANA MARÍA MANTEROLA MORALES

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. ABRIL, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente estudio se realizó en el **Instituto de Investigaciones Biomédicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, bajo la dirección de la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja**, con apoyo del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** de México 131149 y el programa **UNAM-DGAPA** IN209410-3, IN222113.

---

## A GRADECIMIENTOS

A mis padres, **Sonia Morales Arelio** e **Ismael Manterola Martínez**, por el apoyo incondicional y dirección.

A mis hermanos **Emma** y **Pablo Manterola Morales**.

A mis hermanos de corazón e inseparables **amigos**: Miguel Segura, Samir Antonio, Daniel Andrade, Ofelia Ríos, Karina Huerta, Luis Álvarez, Patricia Estrada, Adriana Carballo, Grace Mellado, Andrea García Santoyo y Karla Sánchez.

A la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja** y su grupo de trabajo: Silvia Armenta, Benjamín García, Silvia Moreno, Paola Aguilera, Beto Martínez, Cinthya Flores, Zaira Sánchez, Jocelín Rizo, Daniel Guillén y Cynthia Argüelles.

Al **Dr. Sergio Sánchez Esquivel** y su grupo de trabajo.

A la **Dra. Tzipe Silvia Govesensky Zack** por su colaboración en el análisis estadístico.

Al **Dr. Alfonso González Noriega** por su asistencia en el microscopio de fluorescencia .

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** de México 131149.

A la Dirección General Asuntos del personal Académico **UNAM-DGAPA** IN209410-3, IN222113.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)**.

Ana María

---

# C O N T E N I D O

---

	<b>Página</b>
I. Introducción.....	<b>1</b>
II. Antecedentes.....	<b>3</b>
III. Justificación.....	<b>18</b>
IV. Objetivo General.....	<b>18</b>
V. Objetivos Particulares.....	<b>18</b>
VI. Hipótesis.....	<b>18</b>
VII. Materiales y métodos.....	<b>19</b>
VIII. Resultados y discusión.....	<b>35</b>
IX. Conclusión.....	<b>49</b>
X. Perspectivas.....	<b>50</b>
XI. Referencias.....	<b>51</b>
XII. Anexo.....	<b>55</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
I.	Almidón.....	5
II.	Estructura del dominio catalítico de las $\alpha$ -amilasas, barril ( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub> .....	7
III.	Mecanismo de doble desplazamiento de las GHs.....	9
IV.	Estructura del SBD de la glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i> .....	12
V.	Arquitectura de la $\alpha$ -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i> .....	13
VI.	Interacción del CBM26 de la $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus halodurans</i> con maltosa.....	14
VII.	Isotermas de adsorción (1-Mod, 2-Mod, 3-Mod, 4-Mod, LaSBD y la $\alpha$ -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i> ).....	15
VIII.	Vector pJET 1.2 (Thermo Scientific).....	20
IX.	Vector pQE-31 (QIAGEN).....	20
X.	Vector pET-15b (Novagen).....	21
XI.	Amplificación por PCR del LaDC.....	22
XII.	Construcción, expresión y actividad amilolítica de la proteína LaDC.....	35
XIII.	Construcción, expresión y actividad amilolítica de la proteína LaDC-CBM26×3.....	37
XIV.	Purificación de la proteína LaDC-CBM26×3 por afinidad a $\beta$ -ciclodextrina.....	38
XV.	Análisis lineal de la adsorción de la proteína LaDC-CBM26×3.....	40
XVI.	Isoterma de adsorción de la proteína LaDC-CBM26×3.....	41
XVII.	ART liberados por la proteína LaDC-CBM26×3 medidos con el método DNS.....	45
XVIII.	Construcción y expresión de la proteína hrGFP-CBM26×3.....	46
XIX.	Ensayo cualitativo de adsorción de la proteína hrGFP-CBM26×3 sobre almidón insoluble.....	47
XX.	Micrografía de fluorescencia, gránulo de almidón.....	48

---

# ÍNDICE DE TABLAS

---

	<b>Página</b>
I. Mezcla de reacción para la amplificación del <i>LaDC</i> .....	22
II. Muestras preparadas para el ensayo de adsorción.....	26
III. Curva estándar de Almidón, determinación de actividad amilolítica por método KI/I.....	29
IV. Actividad amilolítica por método KI/I.....	29
V. Curva estándar de glucosa, determinación de actividad amilolítica por método DNS.....	30
VI. Datos obtenidos del ensayo de adsorción <i>LaDC</i> -CBM26×3 sobre almidón insoluble.....	39
VII. Parámetros de unión $K_p$ y $q_{max}$ .....	40
VIII. Parámetros de unión $K_d$ y $B_{max}$ .....	42

---

## RESUMEN

La adsorción de las amilasas es frecuentemente considerada un prerrequisito para la hidrólisis del almidón insoluble, para esta adsorción las amilasas requieren dominios auxiliares no catalíticos con capacidad para discriminar y unirse específicamente al almidón. La  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (AmyA) posee dos dominios funcionales, el dominio catalítico (*LaDC*) y un dominio de fijación al almidón (*LaSBD*) constituido por cinco módulos de unión a carbohidrato (CBM) idénticos y contiguos. La adsorción al almidón nativo de AmyA, del *LaSBD* que la forma, así como versiones deletadas de este dominio (1, 2, 3 y 4 módulos) ha sido evaluada en estudios previos; el comportamiento de adsorción y los parámetros de unión encontrados sugieren que AmyA se adsorbe al almidón nativo con un número menor de CBMs a los que posee en su estructura. En el presente trabajo se evaluó la funcionalidad de tres CBMs provenientes del *LaSBD* para adsorber las proteínas hrGFP y *LaDC* a los gránulos de almidón nativo, esta última con el objetivo adicional de investigar si la fusión de tres CBMs restablece la actividad del *LaDC* sobre almidón nativo. Los resultados muestran que tres módulos permiten la inmovilización y purificación de la proteína fusionada, así como el restablecimiento de la actividad amilolítica en *LaDC*. El análisis de los datos de adsorción indica que no hay diferencia significativa entre los parámetros de unión de AmyA y *LaDC*-CBM $\times$ 3. Sin embargo, los ensayos de actividad enzimática sugieren que AmyA es más eficiente en la degradación del sustrato insoluble.

# INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son biomoléculas involucradas en diferentes procesos de la vida tales como el metabolismo, soporte estructural, almacenamiento de energía, reconocimiento inmunológico, unión selectiva, etc. Para hacer frente a esta multiplicidad de funciones, diversas proteínas que tienen actividad sobre carbohidrato poseen módulos no catalíticos que interactúan específicamente con mono, oligo y polisacáridos. En general, estos módulos de unión a carbohidratos (CBM-*Carbohydrate Binding Modules*) son dominios auxiliares con plegamiento autónomo y experto reconocimiento del carbohidrato blanco (Boraston *et al.* 2004).

Los CBMs han sido clasificados de acuerdo a la similitud de su secuencia primaria y plegamiento en la base de datos de enzimas que tienen actividad sobre carbohidrato <http://www.cazy.com> (Cantarel *et al.* 2009), la información contenida en este sitio se actualiza y analiza continuamente, de tal manera que nuevas familias son añadidas con frecuencia. A la fecha hay 46,439 CBMs clasificados en 71 familias.

El elemento conformacional más importante en la mayoría de los CBMs es la hoja beta, los plegamientos y arquitecturas visualizadas por estas hojas beta han sido clasificadas en 7 familias en donde el  $\beta$ -sándwich es el plegamiento más recurrente (Boraston *et al.* 2004). Los residuos involucrados en los sitios de unión han sido identificados mediante estudios de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y mutagénesis sitio dirigida. En general, es bien sabida la importancia de los residuos aromáticos implicados en los sitios de unión, especialmente el triptófano y algunos residuos de tirosina altamente conservados, los cuales establecen interacciones de van der Waals con el carbohidrato. Además, algunos aminoácidos polares estabilizan la interacción mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupo hidroxilo del mismo sustrato. Se ha sugerido que la orientación de los residuos aromáticos de los CBMs proporcionan las especificidades hacia los diferentes ligandos.

En enzimas como las glucósido hidrolasas (proteínas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos) el papel principal de los CBMs es aproximar el sustrato hacia el sitio catalítico mediante la unión específica. Una función adicional que se ha observado en algunos CBMs de glucoamilasas y celulasas es modificar la estructura de la superficie del polisacárido (Gourlay *et al.* 2012; Lee *et al.* 2000; Southall *et al.* 1999). La consecuencia biológica de estos eventos es el incremento de la hidrólisis de sustratos insolubles.

El dominio de fijación al almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (*LaSBD*), bacteria ácido láctica Gram positiva aislada de una fermentación de maíz, posee una estructura completamente diferente a los SBDs comunes, ya que está formado por cinco unidades idénticas y contiguas de 91 aminoácidos (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000). Se ha establecido que cada unidad repetida corresponde a un módulo de unión a carbohidrato de la familia veintiséis (CBM26). Estudios de mutagénesis dirigida en un CBM26 del *LaSBD* señalan un sitio de unión en el módulo, así también que la interacción está soportada por tres residuos aromáticos siendo el triptófano el más importante. La mutación de este residuo abate por completo la capacidad de unión al sustrato (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2009).

Al evaluar la adsorción de la  $\alpha$ -amilasa nativa (AmyA), de los cinco CBMs que forman el *LaSBD* y versiones deletadas del mismo (1, 2, 3 y 4 módulos) sobre almidón de maíz insoluble. Resalta que AmyA presenta una constante de afinidad intermedia a 2 y 3 módulos, y no semejante a la de cinco módulos (Guillén *et al.* 2007). Esta observación sugiere que la  $\alpha$ -amilasa podría adsorber al almidón con un número menor de módulos a los que posee en su estructura. En este contexto y dadas las variadas aplicaciones biotecnológicas que posee el *LaSBD*, herramienta para inmovilizar antígenos sobre almidón insoluble y tallo de purificación para proteínas recombinantes (Guillén *et al.* 2013; Moreno-Mendieta *et al.* 2014), es importante evaluar la funcionalidad de un menor número de módulos para adsorber proteínas a los gránulos de almidón.

# ANTECEDENTES

## *Almidón*

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas, es sintetizado en forma de gránulos insolubles densamente empaquetados (aún accesibles a enzimas catabólicas) en estructuras vegetales como hojas, tallos, raíces, flores, frutos y semillas. Representa la fuente de energía en periodos de dormancia, estrés o reinicio del crecimiento. Los gránulos son producidos con variada morfología (ovalado, esférico, poligonal, lenticular, forma de disco/plato o irregular), tamaño (0.5-110  $\mu\text{m}$  de diámetro) y composición. Estos aspectos juegan un papel importante en las propiedades físicas y funcionales del almidón (Copeland *et al.* 2009; Tester *et al.* 2004).

Los gránulos tienen una estructura jerárquica que puede ser observada fácilmente por microscopía óptica y electrónica. Múltiples capas concéntricas amorfas y cristalinas forman los anillos de crecimiento, alternan e incrementan el diámetro desde el hilum el cual se cree es el inicio de la biosíntesis hacia la superficie de los gránulos. Los anillos de crecimiento poseen de 120 a 400 nm de espesor y son considerados para representar las fluctuaciones diurnas en la deposición de almidón en tejidos de almacenamiento, figura I-A (Copeland *et al.* 2009).

Además de componentes minoritarios como lípidos, minerales, fósforo y proteínas/enzimas, los gránulos de almidón están formados por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina (BeMiller & Whistler, 2009).

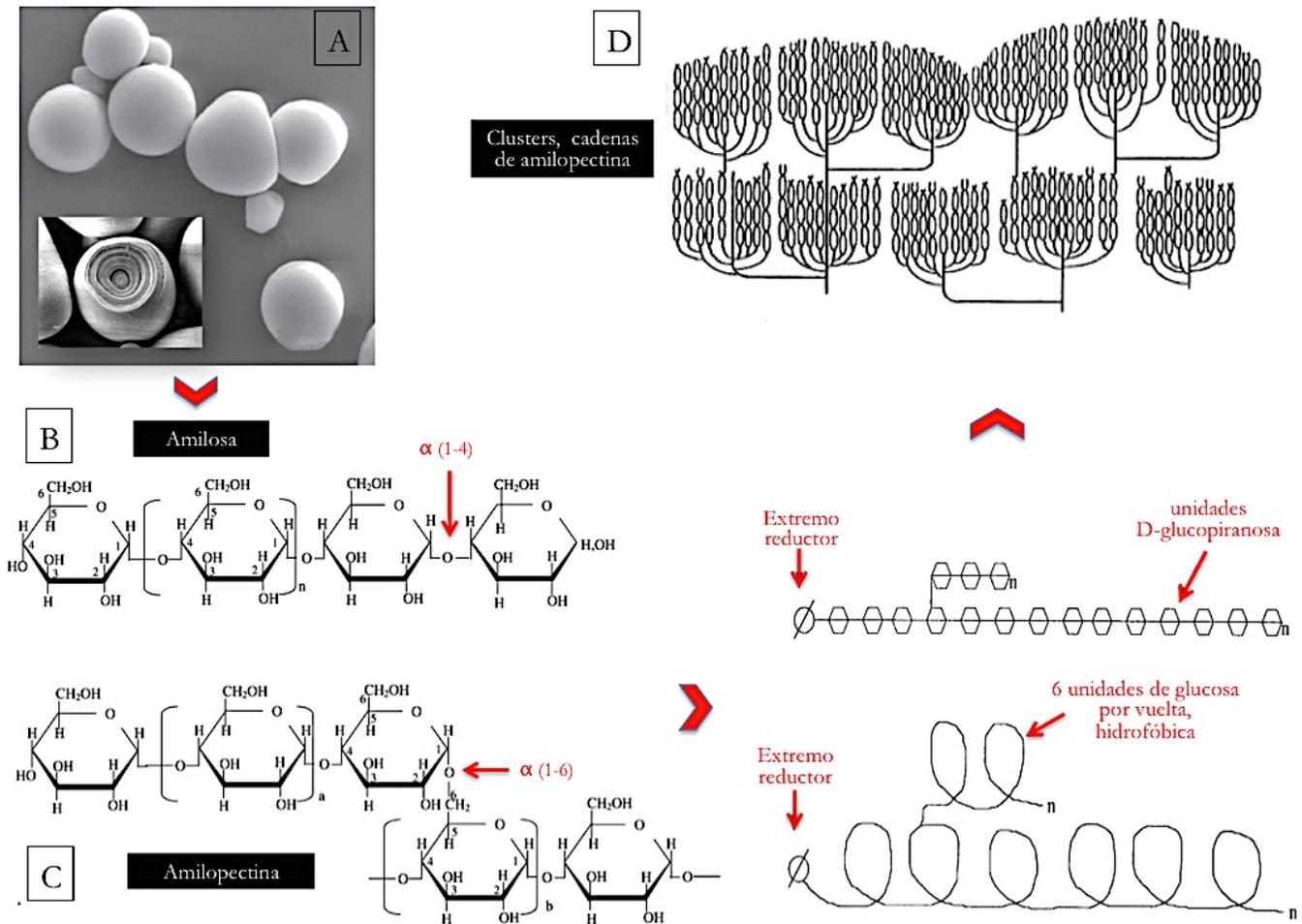
La amilosa es un  $\alpha$ -glucano predominantemente lineal unido por enlaces  $\alpha$ -1,4 (Copeland *et al.* 2009; Curá *et al.* 1995), tiene estructura helicoidal en donde se presentan 6 residuos de glucosa por vuelta, figura 1-B, la parte interna de la estructura contiene átomos de hidrógeno y es de carácter hidrofóbico lo que permite formar complejos con ácidos grasos, algunos alcoholes y yodo (Fennema, 1985).

La capacidad del gránulo de almidón para formar un gel después de ser calentado se atribuye al alto contenido de amilosa, como sucede en el almidón de maíz, trigo y arroz. La formación de geles es el resultado de la reasociación de polímeros de almidón solubilizados después de calentar y ocurre rápidamente con el polímero lineal de amilosa (Copeland *et al.* 2009; Voet *et al.* 2006).

La amilopectina está formada por residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 dispuestos en una estructura altamente ramificada con enlaces  $\alpha$ -1,6 cada 24 a 30 residuos de glucosa en promedio (Figura I-C). Este polisacárido ramificado es el mayor componente del gránulo y es de mayor tamaño que la molécula de amilosa, posee un peso molecular elevado en el orden de  $10^8$  y un grado de polimerización ó GP (número de unidades de glucosa que forman al polisacárido) que puede exceder un millón, lo que la convierte en una de las moléculas más grandes en la naturaleza (Copeland *et al.* 2009; Tester *et al.* 2004). La mayoría de los almidones contienen 60-90% de amilopectina, incluso aquellos que se consideran con alto contenido de amilosa, poseen al menos el 30% de amilopectina; en el otro extremo encontramos a los almidones céreos que son al menos 95% amilopectina. Esta molécula tiene alrededor del 5-6 % de sus glucosas en uniones  $\alpha$ -1,6 que habla de un alto grado de ramificación así como de una arquitectura molecular compleja que varía sustancialmente entre diferentes almidones, respecto a la ubicación y longitud de las ramificaciones (Tester *et al.* 2004).

Los estudios respecto al tamaño de las cadenas de amilopectina sugieren una distribución bimodal, cadenas largas y cortas con longitudes promedio de 40-60 y 11-25 residuos de glucosa respectivamente. Esta configuración contribuye a una disposición ordenada dentro del gránulo de almidón y a la naturaleza cristalina de la amilopectina (Bertolini, 2009).

Robin *et al.* 1974 propusieron el modelo de clúster para explicar el arreglo de la amilopectina en el gránulo de almidón, basados en modelo sugerido previamente por Nikuni y French (Nikuni, 1978). En este modelo los puntos de ramificación en las moléculas de amilopectina no están distribuidos al azar, están agrupados y se alinean perpendicularmente a los anillos de crecimiento, figura I-D (BeMiller & Whistler, 2009).



**Figura I.** **A:** Microscopía electrónica de gránulos de almidón, se observan anillos de crecimiento; **B:** cadena de amilosa; **C:** amilopectina: enlace  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación; **D:** Modelo de los clusters de amilopectina (Tomado y modificado de Tester *et al.* 2004).

Las cadenas de amilopectina son las responsables de las regiones cristalinas dentro del gránulo, mientras que la región amorfa del almidón granular es heterogénea, formada por amilosa y puntos de ramificación de la amilopectina (Bertolini, 2009).

Existe una gran variedad de enzimas que tienen actividad sobre almidón, básicamente éstas pueden ser divididas en cuatro grupos: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificantes y transferasas (van der Maarel *et al.* 2002):

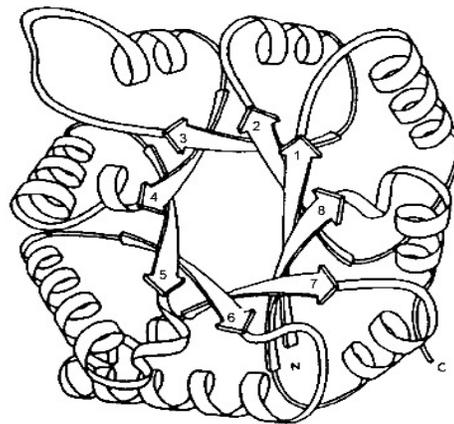
1. Endoamilasas: Hidrolizan enlaces internos  $\alpha$ -1, 4 manteniendo la configuración  $\alpha$  del carbono anomérico,
2. Exoamilasas: Rompen enlaces  $\alpha$ -1, 4 ó  $\alpha$ -1, 6 de los residuos externos de glucosa en el almidón con inversión en la configuración del carbono anomérico, pasándolo de la configuración alfa a la beta,
3. Enzimas desramificantes: Hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1, 6 dejando exclusivamente polisacáridos lineales, y
4. Transferasas: Escinden enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1, 4 de la molécula donante y transfieren parte de la molécula donante a un aceptor glucosídico, formando un enlace glicosídico nuevo (Sivaramakrishnan *et al.* 2006).

### *$\alpha$ -amilasas*

Las  $\alpha$ -amilasas (E.C.3.2.1.1) pertenecen a la familia de las endo-amilasas que (i) catalizan la hidrólisis y/o transglicosilación en los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6; (ii) actúan reteniendo la configuración  $\alpha$  del carbono anomérico; (iii) tienen cuatro regiones de secuencias altamente conservadas que contienen residuos implicados en la catálisis y en la unión al sustrato; (iv) poseen los residuos Asp, Glu y Asp como aminoácidos catalíticos y (v) un dominio catalítico ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> o barril TIM. Los productos de la hidrólisis de las  $\alpha$ -amilasas son glucosa, maltosa y dextrinas (Horváthova *et al.* 2001). La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas son enzimas dependientes de iones metálicos, principalmente iones divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  (Sivaramakrishnan *et al.* 2006). En el caso del ión  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha demostrado que es importante para la actividad, integridad estructural y estabilidad de la enzima (Sudha, 2012).

Las  $\alpha$ -amilasas están presentes en microorganismos, plantas y animales (Gupta *et al.* 2003). Aquellas de origen microbiano son de gran importancia y demanda industrial (Pandey *et al.* 2000) debido a su uso en procesos que requieren la transformación del almidón (Vengadaramana, 2013). Representan aproximadamente el 25% de la producción mundial de enzimas y por esta razón existe un enorme interés en el desarrollo  $\alpha$ -amilasas con mejores propiedades, adecuadas para aplicaciones industriales y técnicas de producción rentables (Monteiro *et al.* 2010).

Estructuralmente, el dominio catalítico de todos los miembros de la familia  $\alpha$ -amilasa adoptan estructura plegada de un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> ó barril TIM, porque fue primero encontrada en la enzima de pollo triosa fosfato isomerasa, figura II. El barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> consiste en ocho  $\beta$ -plegadas alternadas con ocho  $\alpha$ -hélices. Las  $\beta$ -plegadas están colocadas paralelas entre sí como si estuvieran en un cilindro y las  $\alpha$ -hélices están fuera del cilindro. Este barril TIM contiene cuatro regiones altamente conservadas estrechamente relacionadas con



**Figura II.** Ejemplo ilustrativo del plegamiento clásico del barril TIM ó ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Compuesto por ocho  $\beta$ -plegadas (1-8) que forman el interior del barril- $\beta$ , rodeado por ocho  $\alpha$ -hélices. Hay ocho unidades ( $\beta$ - $\alpha$ ) en un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> regular (Horváthova *et al.* 2001).

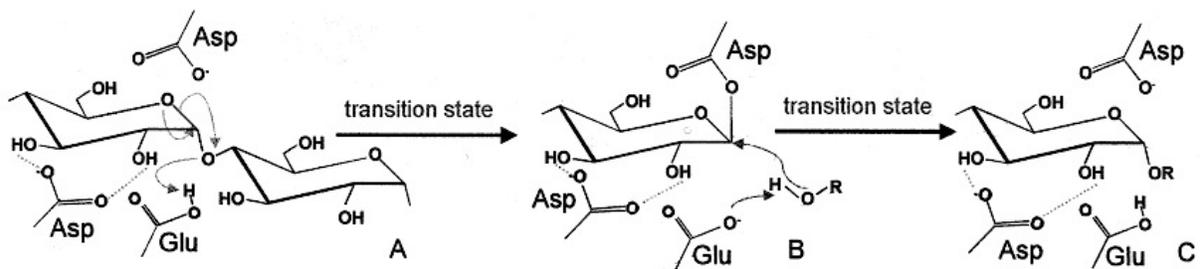
el sitio activo en todas las  $\alpha$  amilasas: (i) primera región: extremo C-terminal de la tercera  $\beta$ -plegada y el residuo de histidina el cual interactúa con el residuo de glucosa del sustrato. (ii) segunda región: cuarta  $\beta$ -plegada con un residuo Asp, que actúa como el nucleófilo durante la catálisis, (iii) tercera región: quinta  $\beta$ -plegada con un residuo de ácido glutámico actúa como donador de protones/aceptor, y (iv) cuarta región: séptima  $\beta$ -plegada con un residuo de histidina y un residuo Asp que puede formar puentes de hidrógeno con los residuos de glucosa del sustrato (Sivaramakrishnan *et al.* 2006).

Los loops que conectan a las  $\beta$ -plegadas con las  $\alpha$ -hélices adyacentes en el dominio catalítico de las  $\alpha$ -amilasas son usualmente pequeños, sin embargo, el loop que protruye entre la tercera  $\beta$ -plegada y la tercera  $\alpha$ -hélice es lo suficientemente largo para ser considerado un dominio distinto conocido como dominio B, este loop posee una estructura irregular y varía sustancialmente en longitud y secuencia. Además de contribuir con varios residuos que funcionan como sitios de unión al sustrato, este dominio tiene un residuo Asp invariable, en una región conservada cerca del C-terminal, que está involucrado en la unión al ión  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque no todas las  $\alpha$ -amilasas son proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La función de este dominio ha sido estudiado en varias  $\alpha$ -amilasas y se ha encontrado que puede determinar propiedades de función y estabilidad, como estabilidad a bajos valores de pH (Horváthova *et al.* 2001).

La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas contienen, adicional al dominio A catalítico y al B, un tercer dominio denominado C, justo después del barril  $(\beta/\alpha)_8$ . Este dominio, formado por  $\beta$ -plegadas antiparalelas, puede proteger del disolvente a los residuos hidrofóbicos del barril  $(\beta/\alpha)_8$ , contribuyendo de esta forma a la estabilidad. Algunas  $\alpha$ -amilasas cuentan con un dominio adicional denominado E que tiene la función de reconocer y unirse al almidón por lo que se ha denominado dominio de fijación al almidón ó SBD. El dominio D se ha descrito en ciclodextrin-glucanotransferasas-CGTasas (Horváthova *et al.* 2001), sin embargo aún no se le ha asignado una función específica.

El mecanismo catalítico de las proteínas de la familia de las  $\alpha$  amilasas consiste en un doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$  del carbono anomérico. Este proceso requiere dos residuos catalíticos en el sitio activo de la enzima, un Glu como ácido/base y un Asp como nucleófilo, figura III. El mecanismo involucra cinco pasos: (i) Una vez que el sustrato ha sido unido al sitio activo, el ácido glutámico dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico entre los subsitios -1 y + 1, mientras que el aspartato nucleófilo 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 (van der Maarel *et al.* 2002).



**Figura III.** Mecanismo de doble desplazamiento y formación de un intermediario covalente por el cual las glucosidas actúan (van der Maarel *et al.* 2002).

### *Módulos de Unión a Carbohidrato*

La degradación enzimática de polisacáridos insolubles es de amplia importancia en la naturaleza, para ello, las enzimas que degradan este tipo de sustratos deben ser capaces de reconocer y unirse específicamente al carbohidrato blanco. Se ha establecido que los encargados de satisfacer esta función son los módulos de unión a carbohidrato (Boraston *et al.* 2004).

Los módulos de unión a carbohidrato ó CBMs (*Carbohydrate Binding Modules*) son secuencias de aminoácidos que poseen plegamiento autónomo, se encuentran como proteínas aisladas o formando parte de una proteína que tiene actividad sobre carbohidrato, tienen la capacidad de reconocer entre los diferentes arreglos heterogéneos y complejos de

los carbohidratos haciendo la unión al azúcar reversible. Pueden actuar como módulos de anclaje en enzimas multimodulares como las glucósido-hidrolasas y las glucosil-transferasas, también en proteínas no catalíticas como en la proteína CBP21 de *Serratia marcescens* y en la proteína E7 y E8 de *Thermobifida fusca* (Cantarel *et al.* 2009; Guillén *et al.* 2010).

En enzimas que tienen actividad sobre carbohidrato como las glucósido hidrolasas, los CBMs pueden estar localizados en el N-terminal o C-terminal (Abe *et al.* 2004; Juge *et al.* 2002), entre dos módulos catalíticos, como una sola unidad o en un arreglo en tándem. Frecuentemente estas enzimas contienen múltiples CBMs que pueden estar en tándem o separados por otros módulos, a menudo son de la misma familia pero no es necesario (Boraston *et al.* 2002).

El papel principal de los CBMs es reconocer y unirse específicamente a carbohidratos, la consecuencia biológica de este evento es el incremento de la hidrólisis de sustratos insolubles, haciendo que el dominio catalítico se encuentre más próximo al sustrato. Además, algunos CBMs han mostrado participación en el acceso al sustrato, mediante la desestabilización de estructuras cristalinas (McCartney *et al.* 2004).

El elemento conformacional más importante de la mayoría de los CBMs es la lámina- $\beta$  (Boraston *et al.* 2004). Las características que permiten el reconocimiento, ya sea promiscuo o específico, han generado un importante número de estudios, en especial impulsados por las aplicaciones potenciales de estos dominios. Los residuos involucrados en los sitios de unión han sido identificados mediante datos estructurales de cristalografía de rayos X, magnética nuclear y mutagénesis dirigida (Boraston *et al.* 2006; Najmudin *et al.* 2006, Rodríguez-Sanoja *et al.* 2009, Sorimachi *et al.* 1996). Los análisis indican que los CBMs de diferentes familias son estructuralmente similares y que la capacidad para unir carbohidratos puede ser atribuida, al menos en parte, a varios aminoácidos aromáticos cuyos anillos empalman con los anillos del azúcar (Shoseyov *et al.* 2006).

Además, los residuos del lado polar de la cadena pueden formar puentes de hidrógeno con el ligando, contribuyendo a estabilizar la interacción. Varios estudios sugieren que la orientación de los residuos aromáticos es responsable de la especificidad a diferentes ligandos de las familias de CBMs (Guillén *et al.* 2010).

La ausencia de CBMs en el 60% de las celulasas ha sido explicado en sistemas con bajas cantidades de agua en donde se incrementa la probabilidad de que la enzima interaccione con el sustrato. A bajas concentraciones del sustrato los CBMs son muy importantes para la catálisis, dado que los CBMs incrementan la afinidad de las enzimas por su sustrato (Várnai *et al.* 2013).

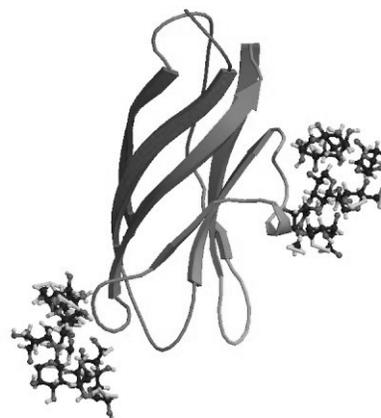
#### *Dominio de fijación al almidón*

Si bien la especificidad de los CBMs es variada, de acuerdo a la clasificación de CAZY (<http://www.cazy.com>) los dominios de unión al almidón ó SBD (*Starch Binding Domain*) pertenecen a once familias diferentes de módulos de unión a carbohidrato: 20, 21, 25, 26, 34, 41, 45, 48, 53, 58 y 69.

El SBD ha sido identificado en  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, maltotetrahidrolasas, maltopentahidrolasas, proteína cinasa activada por AMP, pululanasa, ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasa), almidón sintasa, acarviosa transferasas y glucoamilasas; en enzimas amilolíticas microbianas, en particular aquellas de hongos filamentosos, bacterias Gram positivas, proteobacterias de la subdivisión  $\gamma$ , actinomicetos y arqueas (Cantarel *et al.* 2009; Rodríguez-Sanoja *et al.* 2005a).

El SBD (CBM20) de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* fue la primera estructura en ser dilucidada y se ha tomado como un SBD representativo. Este dominio consiste en ocho  $\beta$  plegadas que forman dos láminas- $\beta$ : la primera lámina contiene cinco  $\beta$  plegadas antiparalelas

y la segunda incluye una  $\beta$  plegada paralela y un par de cadenas antiparalelas. Este ensamble genera una estructura de barril- $\beta$  abierto por un lado, con un puente disulfuro entre el N-terminal y el bucle formado por la séptima y octava  $\beta$  plegada. La estructura tridimensional muestra la presencia de dos sitios de unión a sustrato, figura IV (Sorimachi *et al.* 1996). A la fecha, las estructuras cristalográficas de diversas  $\alpha$ -amilasas se ha resuelto y se observa que a pesar del bajo porcentaje de identidad en secuencia primaria, las estructuras tridimensionales son muy parecidas. Por ejemplo, el SBD de la CGTasa de



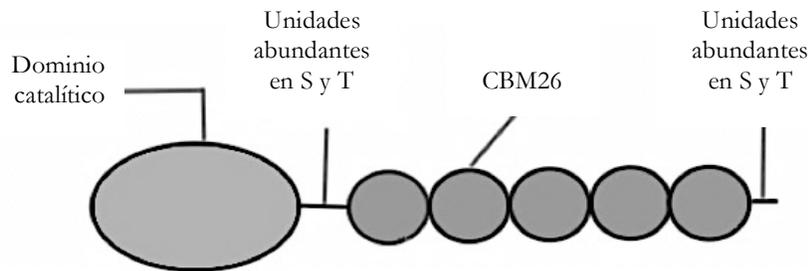
**Figura IV.** Estructura del SBD de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* en complejo con ciclodextrina. Se presentan dos sitios de unión al sustrato. PDBID: 1ACO (Sorimachi *et al.* 1996).

*Bacillus circulans* muestra 37% de identidad en secuencia de aminoácidos con la glucoamilasa de *A. niger*. Sin embargo, las estructuras tridimensionales son muy similares en las características de sus láminas  $\beta$  así como en la posición y la longitud de las  $\beta$  plegadas. A pesar de que el puente disulfuro está ausente en la CGTasa, esta condición no afecta la unión al sustrato (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2005a).

En amilasas, los SBD tienen tres papeles conocidos: permiten la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima en solución, acerca el sustrato al sitio activo de la enzima en dominio catalítico y en algunos casos puede tener una función desestabilizadora en la superficie del gránulo de almidón. En diversas amilasas, la adsorción de la enzima es un prerequisite para la hidrólisis del almidón nativo (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2005a).

## $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*

La  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (AmyA) es una proteína de 105 kDa constituida por 953 aminoácidos y dos dominios funcionales, cinco unidades repetidas de 91 aminoácidos en el C-terminal y un dominio catalítico (GH13) en el N-terminal (Giraud & Cuny, 1997) figura V.

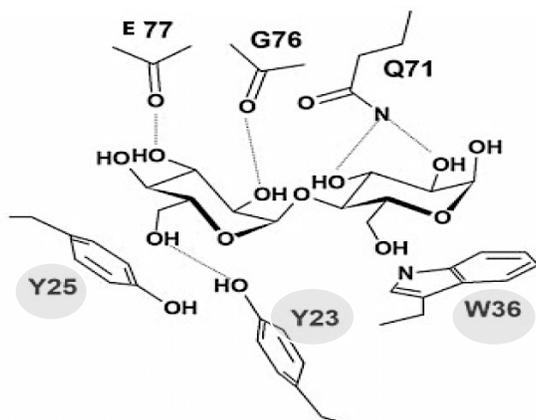


**Figura V.** Arquitectura de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* GenBank: U62096.1. AAC45781.1.

En reportes previos se ha mostrado que la alfa amilasa trunca ( $AmyA\Delta$ ) que carece de la región carboxilo, región de las unidades repetidas, es incapaz de unirse e hidrolizar almidón insoluble, mientras que la actividad específica de ambas enzimas ( $AmyA$  y  $AmyA\Delta$ ) sobre sustratos solubles es similar, fue entonces cuando se estableció el papel de las unidades repetidas como dominio de fijación al almidón (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000). En base a la secuencia primaria de las unidades repetidas, éstas han sido incluidas en la familia 26 de módulos de unión a carbohidrato ó CBM26 (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2009). Sólo en las familias de CBMs 26 y 34 se tiene registrado la presencia de SBDs de enzimas de lactobacilos (Cantarel *et al.* 2009).

La similitud en secuencia entre los módulos de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y el CBM26 de la  $\alpha$ -amilasa formadora de maltohexaosa (6 glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1, 4) de *Bacillus halodurans*, única estructura resuelta a la fecha, es muy bajo. Sin embargo, algunos residuos aromáticos relacionados con la función de unión están bien conservados (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2009). En este análisis estructura-función se determinó que la unión del CBM26 se establece con los residuos aromáticos W36, Y23 y Y25. Los anillos aromáticos

de W36 y Y25 se empalman con los anillos de piranosa de los dos residuos de azúcar. Mientras que los residuos Y23, E77, G76 y Q71 contribuyen estabilizando la unión mediante puentes de hidrógeno, figura VI (Boraston *et al.* 2006).

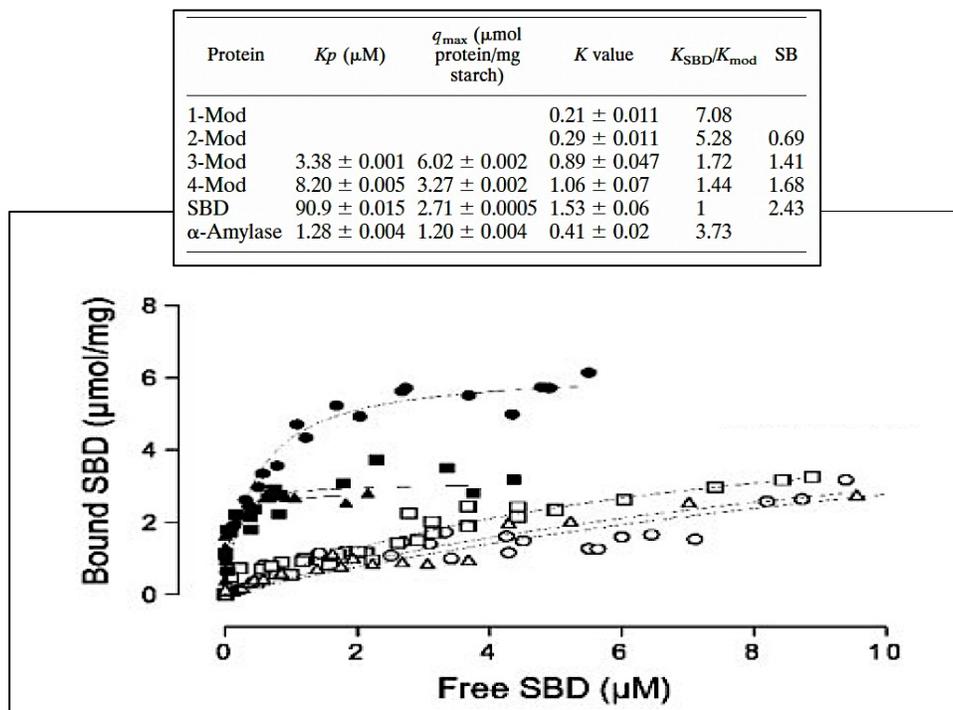


**Figura VI.** Interacciones del CBM26 de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus halodurans* con maltosa (Boraston *et al.* 2006).

Para tratar de explicar el reconocimiento de polisacáridos por el dominio de fijación al almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (*LaSBD*), se investigó la relevancia de residuos aromáticos conservados en uno de los cinco CBM26. Tres aminoácidos fueron identificados como esenciales para la unión, dos tirosinas y un triptófano. Los resultados mostraron, en contraste con la única estructura resuelta de la familia CBM26 (Boraston *et al.* 2006), que la mutación de solo un residuo aromático (W32) en el CBM26 de *L. amylovorus* puede eliminar la habilidad de unión. Considerando las redes de múltiple interacción entre el carbohidrato y el dominio de unión, es de resaltar que la mutación en un solo residuo W32 resulta en el abatimiento de la unión (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2009).

Guillén *et al.* (2007) establecieron la funcionalidad de los cinco CBMs presentes en la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Para ello, se generaron las proteínas correspondientes a 1, 2, 3, 4 y 5 módulos, y se evaluó la capacidad de adsorción de cada una sobre almidón insoluble (Figura VII). Se observó que cada módulo que constituye al *LaSBD* es capaz de adsorberse al almidón de manera independiente, y conforme se aumentan el número de módulos en la proteína hay un incremento en la afinidad de manera sinérgica. En la figura

VII se pueden observar dos comportamientos de adsorción, el primero formado por 1, 2 módulos y AmyA, y el segundo formado por 3, 4 y 5 módulos. Cinco CBMs (*LaSBD*) se adsorben completamente al gránulo hasta una concentración aproximada de 3  $\mu\text{mol}$  de proteína  $\text{mg}^{-1}$  de almidón, a partir del cual se aprecia un cambio en la pendiente de la curva de adsorción. En el caso de tres módulos, estos se adsorben completamente hasta una concentración de 2.5  $\mu\text{mol}$  de proteína  $\text{mg}^{-1}$  de almidón, a partir del cual también se aprecia un cambio en la pendiente de la curva. El cambio en la pendiente hacia la formación de una meseta indica la saturación del sustrato.



**Figura VII.** Isotermas de adsorción de las diferentes proteínas construidas a partir del *LaSBD*. Curvas de unión considerando la proteína libre después del equilibrio;  $\circ$ , 1-Mod;  $\square$ , 2-Mod;  $\bullet$ , 3-Mod;  $\blacksquare$ , 4-Mod;  $\blacktriangle$ , *LaSBD* intacto;  $\triangle$ ,  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. En la tabla se presentan las constantes de afinidad establecidas para cada proteína (Guillén *et al.* 2007).

Por otra parte, la unión de 1 y 2 módulos presenta una tendencia lineal en donde no se aprecia saturación del sustrato incluso a 20  $\mu\text{M}$  de proteína añadida. Esto puede deberse a una interacción débil con el almidón que podría permitir mayor intercambio molecular (Guillén *et al.* 2007).

Las constantes de afinidad  $K_p$  (Figura VII) muestran que al incrementar el número de módulos se obtiene un efecto sinérgico, este fenómeno ha sido observado en celulasas y xilanasas con dos y tres módulos de unión a carbohidrato (Bolam *et al.* 2001; Boraston *et al.* 2006; Linder *et al.* 1997). Un aspecto a resaltar es el valor de la constante de afinidad  $K_p$  de AmyA que es intermedio a los valores encontrados para 2 y 3 módulos. Esta evidencia sugiere que la amilasa interacciona en el proceso de adsorción al almidón nativo con un número menor de módulos a los presentes en el LaSBD. Quizás una disminución de los mismos permitiría conservar la funcionalidad de la proteína en el proceso de adsorción.

Estudios adicionales han explorado posibles aplicaciones biotecnológicas y biomédicas del LaSBD. Pérez en el 2008 demostró la capacidad de unión al almidón del LaSBD puede ser transferida a otra proteína no relacionada. En dicho estudio se fusionó hrGFP (ver anexo) al LaSBD y se observó que la presencia de este dominio no interfiere con el plegamiento funcional de la proteína además de mantener la capacidad de unión al almidón.

En un trabajo reciente se utilizó el SBD de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* como un tallo de afinidad para la purificación de proteínas. Proteínas de diferentes fuentes se fusionaron al LaSBD y se purificaron por cromatografía de afinidad sobre gránulos crudos de almidón. Con fines comparativos las mismas proteínas se purificaron con el sistema His<sub>tag</sub> y se observó que en todos los casos la purificación con el SBD<sub>tag</sub> siempre fue más eficaz que aquella llevada a cabo por el His<sub>tag</sub> en tres niveles: el grado de recuperación de proteínas, la mínima presencia de proteínas co-purificadas, y en los costos de purificación asociados con cada proceso (Guillén *et al.* 2013).

La influencia de los CBMs en la degradación de sustratos insolubles es clara. Gilkes *et al.* (1992) mostraron que remover el CBM2a de la xilanasas 10A de *Cellulomonas fimi* reduce la actividad hidrolítica en la enzima sobre celulosa microcristalina bacteriana, indicando que la presencia del CBM mejora la función de la enzima.

En el caso específico de la AmyA, la presencia de un módulo adicional respecto a *Lactobacillus plantarum* la convierte en una enzima 10 veces más eficiente en la hidrólisis de almidón insoluble, con sólo una pequeña diferencia en las capacidades de adsorción (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2005b; Santiago *et al.* 2005).

# JUSTIFICACIÓN

Estudios previos, en donde se evaluó la adsorción del *LaSBD* y versiones deletadas del mismo (1, 2, 3 y 4 CBMs) sobre almidón nativo, revelan que al incrementar el número de CBMs en una proteína, la afinidad de la misma por el sustrato insoluble aumenta de manera sinérgica. Así también, se encontró que la constante de afinidad calculada para AmyA es intermedia a la de las proteínas conformadas por dos y tres CBMs, este hallazgo sugiere que AmyA se adsorbe al sustrato insoluble con un número menor de módulos a los que posee en su estructura. Si el cambio en el comportamiento de adsorción es a partir de tres CBMs, es posible que este número de módulos permita adsorber proteínas a los gránulos de almidón. Así, el presente estudio contribuye a entender la presencia de múltiples CBMs en glucosido hidrolasas, al mismo tiempo que beneficia las aplicaciones biotecnológicas que se desarrollan en torno al *LaSBD*.

## OBJETIVOS

### General

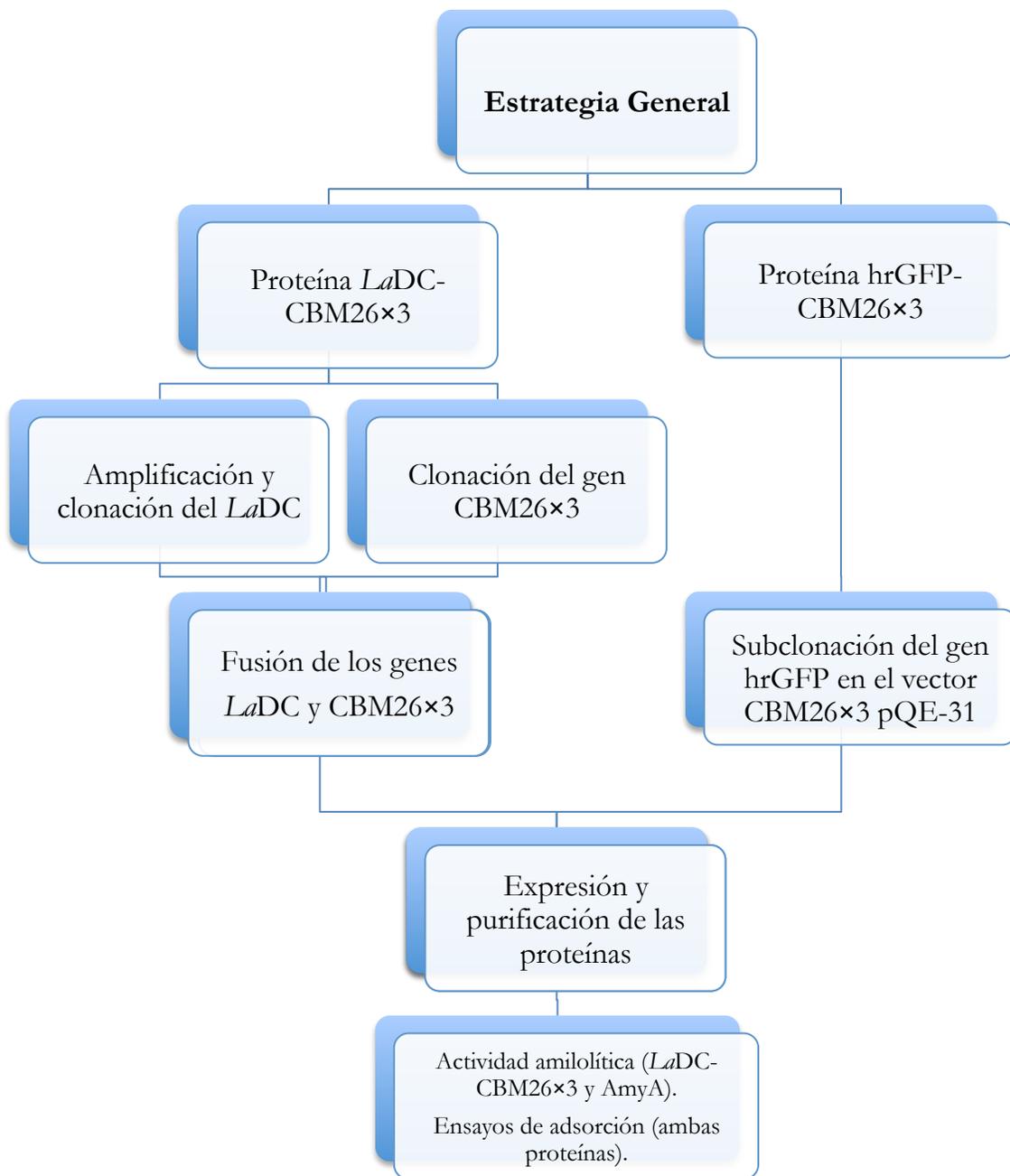
Determinar la funcionalidad de tres CBM26 del *LaSBD* para adsorber proteínas a los gránulos de almidón.

### Específicos

- ~ Investigar si la fusión de tres CBMs al dominio catalítico de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (*LaDC*-CBM26 $\times$ 3) permite la unión y restablecimiento de la actividad amilolítica sobre el sustrato insoluble.
- ~ Comparar la adsorción y actividad amilolítica de la proteína *LaDC*-CBM26 $\times$ 3 sobre almidón nativo, respecto a AmyA.
- ~ Construir y determinar si la proteína de fusión proteína verde fluorescente-tres módulos de unión al almidón (hrGFP-CBM26 $\times$ 3) es capaz de adsorberse al almidón nativo.

## HIPÓTESIS

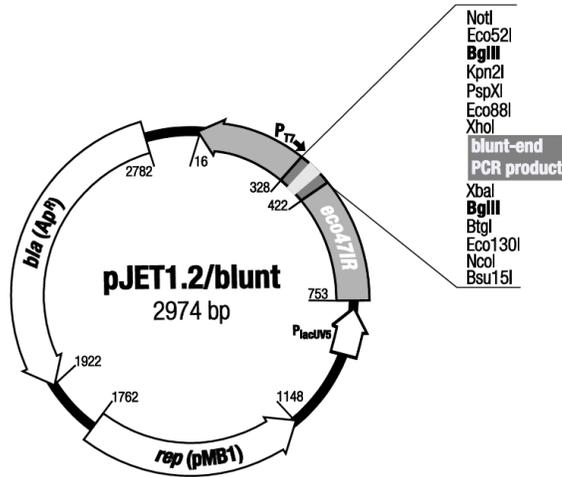
Si tres CBM26, en una proteína de fusión, confieren la afinidad suficiente para adsorber proteínas sobre almidón nativo, entonces la fusión de estos módulos al *LaDC* restablecerá la actividad amilolítica del sustrato insoluble y, por su parte, la fusión a hrGFP permitirá la inmovilización de la proteína en el gránulo y su consecuente fluorescencia.



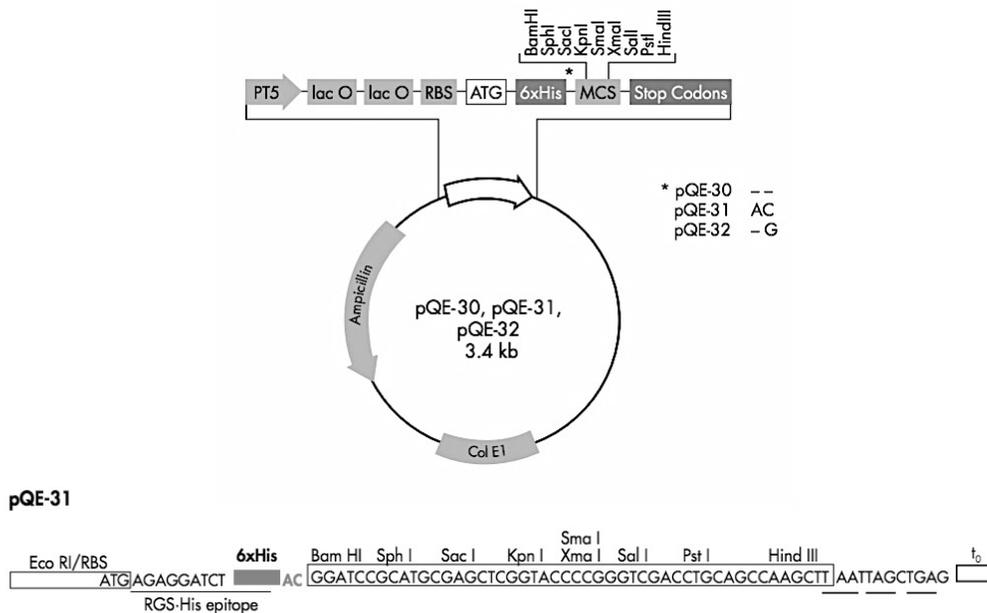
El presente esquema indica la estrategia general empleada en este estudio, la proteína LaDC-CBM26x3 fue construida en el vector pET-15b mientras que la proteína hrGFP-CBM26x3 en el vector pQE-31, esto fue a través de la ligación de los genes correspondientes. Los genes LaDC y CBM26x3 fueron obtenidos por PCR a partir del gen AmyA y hrGFP a partir del vector pIRES-hrGFP-1<sup>a</sup> (Pérez, 2008) ver anexo. La adsorción de las proteínas sobre almidón insoluble fue determinada mediante ensayos cualitativos e isotermas de adsorción. La actividad amilolítica de LaDC-CBM26x3 y AmyA fue evaluada mediante el método DNS.

Plásmidos

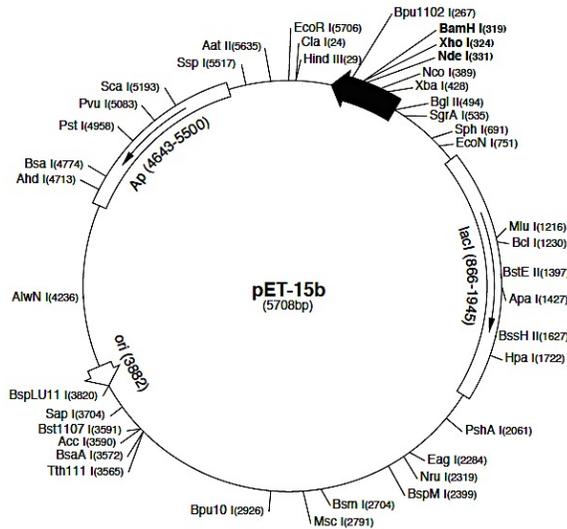
El mapa de los vectores utilizados para la clonación, construcción y expresión de las fusiones se ilustran a continuación:



**Figura VIII.** El vector pJET 1.2 Thermo Scientific fue empleado para clonar el producto de PCR del *LaDC. eco471R*: gen letal que permite la selección positiva de plásmidos recombinantes.  $P_{lacUV5}$ : promotor *lacUV5*. Sitio de clonación múltiple.  $P_{T7}$ : promotor de la T7 RNA polimerasa. *bla* ( $Ap^R$ ): gen  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. *rep*(pMB1): replicón del plásmido pMB1, responsable de la replicación del pJET1.2.



**Figura IX.** Vector pQE-31 QIAGEN. Empleado para la expresión de la proteína hrGFP-CBM26×3. 6×His-tag en el N-terminal. PT5: promotor T5. lac O: 2 operadores lac. RBS: sitio de unión a ribosoma. ATG: codón de inicio de la traducción. MCS: Sitio de clonación múltiple. Col E1: Origen de replicación, pBR322. Ampicillin: gen  $\beta$ -lactamasa que otorga resistencia a ampicilina.



**Figura X.** Vector pET-15b (Novagen). Empleado para la producción de la proteína *LaDC-CBM26*×3. T7: promotor T7. Sitio de clonación múltiple (*NdeI-BamHI*). Terminador T7. *lacI*: gen del represor lacI, ori: origen de replicación pBR322. Ap: gen de la β- lactamasa que otorga resistencia a ampicilina.

### Proteína *LaDC-CBM26*×3

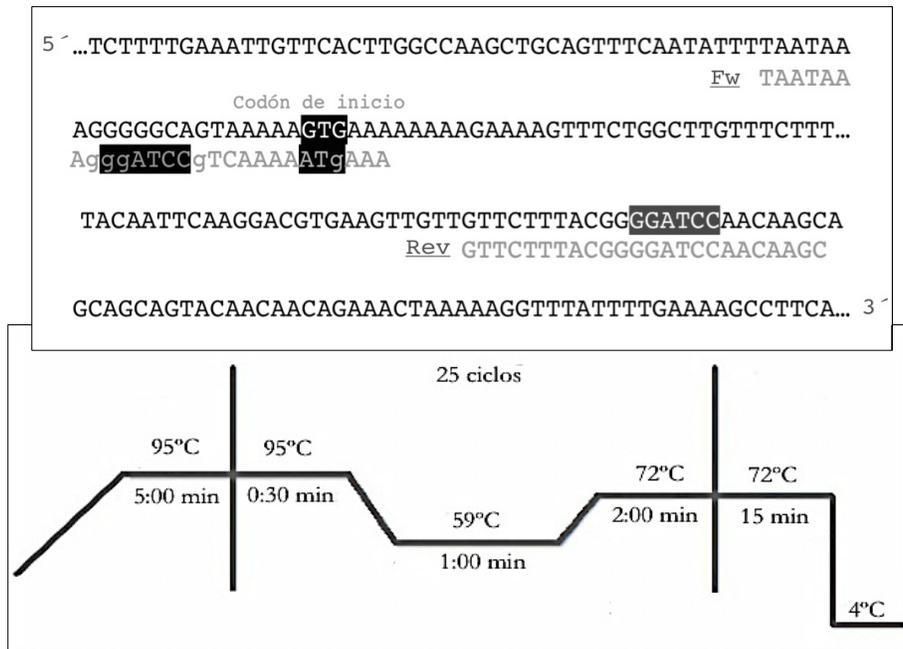
#### Construcción del plásmido *LaDC-pET22b*

El gen *AmyA* está contenido en el vector pLPCR 2-3, a partir del cual se amplificó el dominio catalítico (*LaDC*) con sitios *BamHI* flanqueantes (Figura XI). Se probó añadir a la reacción diferentes concentraciones de  $MgSO_4$  (1, 1.5, 2 y 2.5 mM), DNA molde (100, 10 y 1 ng) así como diferentes temperaturas de alineamiento. La mezcla de reacción en la que se obtuvo mayor cantidad de fragmento amplificado se muestra en la tabla I, los oligonucleótidos empleados y el ciclo de amplificación se muestran en la figura XI. Se analizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente en peso al *LaDC* fue purificada por columna de fibra de vidrio, el DNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y ligado al vector pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific).

**Tabla I.** Mezcla de reacción para la amplificación del *LaDC*.

	<b>C<sub>r</sub></b>
Agua libre de nucleasas	Cbp 25 ml
Tampón 10X <i>Pfu</i> sin MgSO <sub>4</sub>	1X
Tampón MgSO <sub>4</sub>	2.5 mM
dNTPs 10 mM	0.2mM
Primer Fw 25mM	0.8 mM
Primer Rev	0.8 mM
DNA molde	100 ng
<i>Pfu</i> DNA polimerasa (Thermo Scientific)	1U

El *LaDC* fue subclonado *Bam*HI/*Bam*HI en el vector de expresión pET-22b (Novagen), el sentido del inserto fue determinado mediante ensayos de restricción, obteniéndose *LaDC*-pET22b para verificar su expresión en el sistema *Escherichia coli* BL21(DE3). La actividad amilolítica del dominio catalítico fue corroborada *in situ* en un zimograma.



**Figura XI.** Oligonucleótidos y ciclo de amplificación para el *LaDC*.

El zimograma se realizó mediante la tinción con solución KI/I-. Para renaturalizar a la enzima el gel se lavó con agua destilada y con tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 (2 lavados de 15 min), se adicionó tampón fresco y se dejó durante una noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubó 2 h a temperatura ambiente con almidón soluble Prolabo al 1% en tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0. Finalmente el gel se tiñó con KI/I- dilución 1:8.

#### *Construcción del plásmido LaDC-CBM26×3 pET15b*

Para realizar la construcción *LaDC-CBM26×3* en pET15b, primero el gen *CBM26×3* se obtuvo del plásmido *CBM26×3 pQE-31* (Guillén *et al.* 2007) y se subclonó en el vector pET-15b en los sitios *BamHI/Bpu1102*. Se verificó la construcción por restricción y secuenciación, además de la expresión de la proteína *CBM26×3* por Western Blot con un anticuerpo anti-His (Roche).

Por otro lado, el *LaDC* fue obtenido por digestión *BamHI/BamHI* del vector *LaDC-pET22b*. Manteniendo la anatomía de la amilasa nativa, el *LaDC* fue clonado hacia el 5' de las tres unidades repetidas, en el sitio *BamHI*. El sentido del inserto fue determinado mediante digestión enzimática, *BclI* y *PstI*. La proteína fue expresada en *Escherichia coli* BL21(DE3) y la actividad amilolítica verificada en zimograma.

#### *Expresión y purificación: proteína LaDC-CBM26×3*

La producción de la proteína se realizó a partir de 1L de cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido *LaDC-CBM26×3 pET-15b* en un matraz Fernbach con medio LB-amp 100µg ml<sup>-1</sup>. Este cultivo fue inducido a una DO<sub>600</sub>=0.6-0.7 con 0.4mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 29°C y 150 rpm (New Brunswick Scientific Psychrotherm Edison N. J. USA Controlled environment incubator shaker) durante 12 h.

La biomasa del cultivo fue obtenida mediante centrifugaciones sucesivas de 10 min a  $11,000\times g$  y resuspendida 10 ml de tampón de lisis, tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 con 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y tritón X-100 al 1% más lisozima  $1 \text{ mgml}^{-1}$  e inhibidor de proteasas (Cocktail Sigma S8820 1X, 1:500). Las células fueron rotas por sonicación (Vibra-Cell Sonics & Materials Inc.) mediante 3 ciclos sucesivos de 15 y 20 seg a 60 Hz alternando con 1 min de enfriamiento en hielo. El sobrenadante fue centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min a  $38,000\times g$  y fue filtrado por una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  (Millipore), se adicionó maltosa a una concentración final de 20 mM.

Aprovechando la presencia de los tres CBM26, la proteína fue purificada usando el sistema AKTA Prime GE Healthcare por cromatografía de afinidad a  $\beta$ -ciclodextrina en una columna de Sefarosa 6B epoxi-activada ( $16\times 35\text{mm}$ ). Después de lavar la columna con tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 a flujo  $1 \text{ mlmin}^{-1}$ , la proteína unida fue eluida con  $9 \text{ mgml}^{-1}$  de  $\beta$ -ciclodextrina en tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0. El flujo fue constante durante el proceso,  $1 \text{ mlmin}^{-1}$ . Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y dializadas empleando una membrana de 50 kDa y 4L de tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 en agitación constante (muy ligera) a temperatura ambiente durante 6 h. La pureza y el estado de la proteína después de dializar fue corroborada por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie.

La cuantificación de la proteína pura fue por absorción a 280 nm, haciendo uso de la ley de Lambert y Beer (Simonian, 2002), la cual se expresa como  $A = \epsilon * C * l$  donde  $A$  es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de molar de una especie dada,  $C$  es la concentración de la especie responsable de la absorción y  $l$  es el camino óptico en cm.

### *Adsorción al almidón insoluble: proteína LaDC-CBM26×3*

Los ensayos de adsorción consisten en agregar a una cantidad constante de almidón insoluble, diferentes cantidades de la proteína soluble, incubar a 4°C hasta el equilibrio y por absorción a 280nm cuantificar la proteína libre en el sobrenadante (Guillén *et al.* 2007; Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000).

1.- Preparación de la suspensión de almidón: 2g de almidón de maíz insoluble Sigma-Aldrich (S4180-500G) fueron lavados 3 veces con 20 ml de tampón citrato–fosfato 0.1M pH 5.0 y finalmente resuspendidos en 100 ml del mismo tampón (Guillén *et al.* 2007; Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000).

2.- Las muestras se prepararon como se indica en la tabla I, en donde diferentes volúmenes de la proteína pura y dializada fueron adicionados a 30µl de la suspensión de almidón y llevados a un volumen final de 60µl con tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0. Como control de la proteína total añadida en cada tubo, igual número de muestras sin almidón fueron preparadas.

3.- Se permitió la interacción durante 30 min a 4°C en agitación suave. Finalmente la muestra fue centrifugada para cuantificar a la proteína en el sobrenadante.

La concentración de la proteína total y libre fue determinada por absorbancia a 280 nm (Eppendorf BioPhotometer) , empleando el coeficiente de extinción molar teórico ( $\epsilon$ ) obtenido en ExPASy (<http://ca.expasy.org/>) ProtParam. La cantidad de proteína adsorbida al gránulo es la diferencia entre la proteína total y la libre. Los valores de  $\epsilon$  usados fueron los siguientes: para AmyA 207680 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y para el LaDC-CBM26×3 167540 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

**Tabla II.** Muestras preparadas para el ensayo de adsorción,  $V_f=60 \mu\text{l}$ .

Tubo	Muestras con almidón			Muestras sin almidón	
	Suspensión de almidón 1%	T. citrato-fosfato 0.1M pH 5.0	Proteína	T. citrato-fosfato 0.1M pH 5.0	Proteína Abs280 $\approx$ 1
	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$
1	30	30	0	60	0
2	30	28	2	58	2
3	30	26	4	56	4
4	30	24	6	54	6
5	30	22	8	52	8
6	30	20	10	50	10
7	30	18	12	48	12
8	30	16	14	46	14
9	30	14	16	44	16
10	30	12	18	42	18
11	30	10	20	40	20
12	30	8	22	38	22
13	30	6	24	36	24
14	30	4	26	34	26
15	30	2	28	32	28
16	30	0	30	30	30

La afinidad de la proteína por el almidón fue analizada mediante isothermas de adsorción. El análisis lineal de acuerdo a las mediciones de la relación Michaelis/Langmuir, este modelo es comúnmente empleado para describir el fenómeno de adsorción de las glucósido hidrolasas (Guillén *et al.* 2007):

$$q_{ad}/q = K_p \times q_{max}/(1+K_p \times q) \dots \dots \dots (1)$$

en donde  $q_{ad}$  es la proteína adsorbida ( $\mu\text{mol}$  de proteína  $\text{mg}^{-1}$  de almidón),  $q$  es la proteína libre en solución ( $\mu\text{M}$ ),  $K_p$  es la constante de adsorción de Langmuir y  $q_{max}$  es la máxima cantidad de proteína adsorbida por el sustrato (Kyriacou & Neufeld, 1988; Su *et al.* 2012; Yoshida *et al.* 2010). La ecuación de Langmuir presume que la superficie de adsorción es homogénea y no hay interacción entre las moléculas adsorbidas (Guillén *et al.* 2007).

Con el programa *GraphPad Prism Version 4.0* se realizó un análisis de regresión no lineal clásico, empleando la ecuación:

$$Y=B_{max}*X/(K_d+X) \dots\dots\dots(2)$$

que describe la unión de un ligando a su receptor (D'Auria *et al.* 2009; Elloway *et al.* 2004).  $B_{max}$  es la máxima unión específica expresada en  $\mu\text{mol}$  de proteína adsorbida  $\text{mg}^{-1}$  de almidón y representa la unión específica extrapolada a muy altas concentraciones de proteína libre.  $K_d$  es una constante de unión en el equilibrio que mide la fuerza de unión entre la proteína y el ligando, refiere la concentración de proteína libre requerida para lograr la mitad de la máxima unión. El modelo empleado asume que todos los ligandos están igual de accesibles a la proteína, que la unión no altera al ligando ó a la proteína, no permite más de un estado de afinidad o estados de parcial unión, y que la unión es reversible (Bagchi *et al.* 2013; Motulsky & Christopoulos, 2006).

*$\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus**

*Purificación*

La  $\alpha$ -amilasa nativa (AmyA) se obtuvo directamente de un cultivo de *Lactobacillus amylovorus* NRRL-B-4540 Agriculture Research Service culture collection, U.S. Department of Agriculture Peoria. Bacteria aislada de una fermentación de maíz en USA por Nakamura en 1981. *L. amylovorus* se preinoculó al 5% en un volumen de 10 ml de medio MRS (ver anexo) con almidón al 2% y se incubó a una temperatura de 29°C durante 24 h en el equipo New Brunswick Scientific Psychrotherm Edison N. J. USA Controlled environment incubator shaker. Los cultivos de este microorganismo se realizan en ausencia de agitación. El segundo cultivo fue a partir de este último inoculando al 1% 10 ml de medio MRS, 12 h a 29°C. El preinóculo de 12 h se adicionó a 1L de medio MRS más almidón contenido en un matraz Fernbach, y se incubó por 16 h a 29°C (Ramírez, 2010). El sobrenadante del cultivo fue obtenido mediante centrifugación a 11,000×g durante 25 min, y filtrado usando una

membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Al volumen filtrado se agregó inhibidor de proteasas (cocktail Sigma S8820 1X, 1:500).

La proteína AmyA fue purificada del sobrenadante por cromatografía de afinidad como se describe en el estudio de Rodríguez-Sanoja *et al.* (2000) usando una columna de Sepharosa 6B (16 $\times$ 35 mm) epoxi activada acoplada a  $\beta$ -ciclodextrina. El flujo se mantuvo constante durante el proceso, 0.8  $\text{mlmin}^{-1}$ . Los lavados se realizaron con tampón citrato-fosfato pH5, 0.1 M y la elución con 9  $\text{mgml}^{-1}$  de  $\beta$ -ciclodextrina en citrato-fosfato pH5 0.1 M. Se obtuvieron fracciones de 0.5 ml.

El análisis de las fracciones obtenidas se realizó en SDS-PAGE 10%, aquellas de mayor pureza fueron mezcladas y dializadas. En la diálisis se empleó una membrana de 50 kDa y 4L de tampón citrato-fosfato pH5, 0.1M. Posterior a la diálisis, se corroboró la estabilidad y pureza de la enzima en SDS-PAGE 10%.

#### *Actividad amilolítica sobre almidón soluble por el método Yodo-Yoduro*

Se midió la actividad amilolítica de AmyA y LaDC-CBM26 $\times$ 3 sobre almidón soluble por el método Yodo-Yoduro (KI/I<sup>-</sup>) en complejo con el almidón. El ión yoduro I<sup>-</sup> se intercala entre las hélices de la amilosa generando una coloración azul, la ausencia de color indica mayor grado de hidrólisis (Giraud *et al.* 1993).

Se construyó una curva patrón con almidón soluble Prolabo, en concentraciones de 1-12.5  $\text{mgml}^{-1}$  (Tabla III). A cada muestra de la curva patrón se adicionó 2.4 ml de solución yodo-yoduro, después de homogeneizar se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm.

En las pruebas de hidrólisis de ambas enzimas, se incubaron 80 $\mu\text{l}$  de solución de almidón (12.5  $\text{mgml}^{-1}$  en tampón Citrato-fosfato 0.1M pH 5.0) con 10 $\mu\text{l}$  de la enzima pura correspondiente, se incubó a 63°C por 10 min y se detuvo la reacción con 10 $\mu\text{l}$  de solución

de ácido sulfúrico 2N, seguido del enfriamiento en hielo. A cada tubo, control y muestra, se le agregaron 2.4 ml de solución yodo-yoduro al 4%, los tubos se agitaron en vórtex y se leyeron en el espectrofotómetro a 620 nm. Los datos obtenidos de la hidrólisis enzimática de ambas proteínas se aplicaron a la relación (1) de actividad amilolítica siguiente:

$$U/ml = (DO_{control} - DO_{muestra}) \times (1/p) \times 3$$

Donde: U es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 min. 1/p: es el inverso de la pendiente de la curva patrón de almidón (p ó m en la ecuación  $y=mx+b$ ). DO control: densidad óptica del control con la amilasa y almidón sin hidrolizar. DO muestra: densidad óptica de la muestra con la enzima y almidón hidrolizado. 3: Tiempo teórico 30 min. Aproximadamente 7 unidades de enzima, calculadas a través del método yodo-yoduro, fueron empleadas en las pruebas de azúcares reductores.

**Tabla III.** Curva estándar de almidón, determinación de actividad amilolítica por método KI/I.

Tubo	Concentración almidón mg ml <sup>-1</sup>	Stock almidón (12.5 mg ml <sup>-1</sup> ) μl	Citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 μl
1	0	0	100
2	1	8	92
3	2	16	84
4	4	32	68
5	6	48	52
6	8	64	36
7	10	80	20
8	12.5	100	0

**Tabla IV.** Muestras preparadas para determinación de actividad amilolítica por método KI/I.

	Blanco		Muestra
Stock almidón	80 μl	Stock almidón	80 μl
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	10 μl	Enzima	10 μl
Enzima	10 μl	Incubar a 63°C durante 10 min	a 300 rpm. Enfriar en hielo.
Solución Yodo-Yoduro 4%	2.4 ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	10 μl
		Solución Yodo-Yoduro 4%	2.4 ml

El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N detiene la reacción.

*Actividad amilolítica sobre almidón insoluble por el método del ácido 3'-5'-dinitrosalicílico*

La actividad de AmyA y LaDC-CBM26×3 de *Lactobacillus amylovorus* sobre almidón insoluble fue determinada midiendo el aumento de azúcares reductores liberados por la hidrólisis enzimática de almidón de maíz a diferentes tiempos de incubación, en condiciones óptimas de pH y temperatura, 5 y 63°C respectivamente (Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000). Los azúcares reductores se cuantificaron por el método del ácido 3'-5'-dinitrosalicílico (DNS) empleando glucosa como estándar (Miller, 1959, Rodríguez-Sanoja *et al.* 2000). Las muestras de la tabla V fueron preparadas para la obtención de la curva estándar.

Se preparó un stock de almidón insoluble con citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 de 12.5 mg ml<sup>-1</sup>. La metodología descrita a continuación alterna con periodos de enfriamiento. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 40 µl stock almidón insoluble en presencia de 5 µl de enzima LaDC-CBM26×3, incubación por 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 min a 63°C y 300 rpm en un Thermomixer comfort Eppendorf. La reacción se detuvo con la adición de 250 µl del reactivo DNS y 205 µl agua destilada esterilizada para inmediatamente hervir las muestras por 10 min. Se llevó a un volumen final de 2.5 ml con agua destilada y la lectura de las muestras se realizó a 550 nm.

**Tabla V.** Curva estándar de glucosa, determinación de actividad amilolítica por método DNS.

Tubo	Glucosa [mol]	Stock de glucosa (1 mg ml <sup>-1</sup> ) µl	H <sub>2</sub> O µl	Reactivo DNS µl
1	0.1	25	225	
2	0.2	50	200	
3	0.4	100	150	250
4	0.6	150	100	
5	0.8	200	50	
6	1	250	--	

\*Hervir 10 min – enfriar – V<sub>f</sub>=2.5 ml con H<sub>2</sub>O – Lecturas 550 nm

### *Proteína hrGFP-CBM26×3*

#### *Construcción del plásmido hrGFP-CBM26×3 pQE-31*

El gen de la proteína verde fluorescente del organismo marino *Renilla reniformis* (*hrGFP*) se obtuvo por PCR a partir de vector pIRES-hrGFP-1<sup>a</sup>, se adicionaron sitios de corte *Bam*HI flanqueantes que permitieron subclonarlo en el vector de expresión pQE31 (Pérez, 2008). El gen *hrGFP* fue ligado hacia el 5' de los módulos en el vector *CBM26×3* pQE-31 mediante el sitio de corte *Bam*HI. El sentido de la inserción fue determinada por PCR empleando los oligonucleótidos forward del vector pQE31 pQE-31 III/IV CGGATAACAATTTCACACAG (QIAGEN) y el reverse del gen *hrGFP* CCTGCACGAGTGGGTGGATCC (Pérez, 2008). La construcción fue verificada por restricción y secuenciación.

#### *Expresión: Proteína hrGFP-CBM26×3*

La producción de la proteína hrGFP-CBM26×3 fue evaluada en diferentes cepas de *Escherichia coli* (XL-10 Gold, BL21(DE3) y M15) y diferentes condiciones de cultivo debido a la baja expresión de la proteína. En todos los casos se prepararon 5 ml de cultivo en medio LB-amp 100 µgml<sup>-1</sup> en tubos de rosca de 15 ml. Los cultivos se indujeron a 0.6-0.7 de DO<sub>600</sub> en presencia de diferentes concentraciones de inductor IPTG (0.2, 0.4, 0.5 y 1 mM) a 29°C y 25°C en agitación constante, 150 rpm en el equipo New Brunswick Scientific Psychrotherm Edison N. J. USA. Además, la producción de la proteína fue monitoreada a diferentes tiempos de incubación 8, 12 y 16 h.

La condición finalmente empleada para la producción de esta proteína fue en la cepa *Escherichia coli* XL-10 Gold inducida con 0.4 mM IPTG a 29°C durante 8 h de inducción. Para obtener más proteína soluble, se probó la adición del detergente iónico Sarkosyl 1% y glicerol al 1%. La adición de glicerol al medio de cultivo es empleado para aumentar la cantidad de proteína soluble ya que interactúa formando una interfase anfílica entre residuos hidrofóbicos de la proteína y el ambiente polar (Vagenende *et al.* 2009). En el caso del Sarkosyl, este fue adicionado al tampón de lisis, su uso es común en procedimientos que implican prevención e interrupción de la formación de coagregados por lisis, induce la estabilidad de proteínas. Frankel *et al.* (1991) describe que estos métodos pueden ser útiles para proteínas que se convierten en insolubles después de la expresión bacteriana. La producción de la proteína fue analizada por el reconocimiento del anticuerpo anti-His (Roche).

#### *Adsorción al almidón insoluble: proteína hrGFP-CBM26×3*

Las células de 1L de cultivo (en matraz Fernbach) de *Escherichia coli* XL-10 Gold transformada con el plásmido *hrGFP-CBM26×3 pQE-31* en medio LB-amp 100 µgml<sup>-1</sup>, inducido a 0.6-0.7 DO<sub>600</sub> con 0.4 mM de IPTG e incubado durante 8 h a 29°C y 150 rpm en el equipo New Brunswick Scientific Psycrotherm Edison N. J. USA, fueron obtenidas por centrifugación a 21,000×g durante 20 min y resuspendidas en 10 ml de tampón de lisis, tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 con tritón X-100 al 1% más lisozima 1 mgml<sup>-1</sup> e inhibidor de proteasas (Cocktail Sigma S8820 1X, 1:500). La fracción intracelular fue obtenida mediante sonicación en el equipo Vibra-Cell Sonics & Materials Inc., mediante 3 ciclos sucesivos de 15 y 20 seg a 60 Hz alternando con 1 min de enfriamiento en hielo. El lisado obtenido fue filtrado por una membrana de 0.22 µm (Millipore) y empleado en las posteriores pruebas cualitativas de adsorción.

Diferentes volúmenes del lisado celular (50, 100 y 200  $\mu$ l) fueron puestos en contacto con 500 y 1000  $\mu$ g de almidón de maíz insoluble Sigma-Aldrich (S4180-500G). Se permitió la interacción durante una noche a 4°C en agitación suave (Lab Line maxi rotator). Transcurrido el tiempo de interacción, la muestra fue centrifugada para eliminar el sobrenadante con la proteína no adsorbida, se realizaron tres lavados con 1 ml tampón citrato-fosfato 0.1M pH 7.0 al botón de almidón obtenido. La proteína adsorbida al gránulo de almidón fue eluida con 30  $\mu$ l de solución de  $\beta$ -ciclodextrina 9 mgml<sup>-1</sup> en tampón citrato-fosfato 0.1M pH 7 (Aguilera, 2012). Las fracciones eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot con un anticuerpo anti-His (Roche).

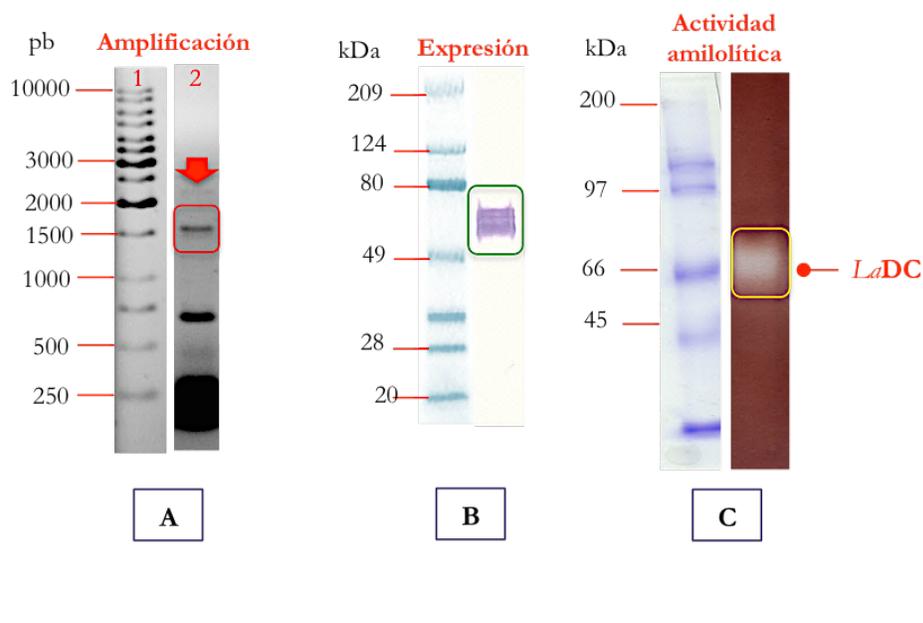
Para visualizar la adsorción de esta proteína al gránulo de almidón, éstos fueron observados en el microscopio de fluorescencia. La siguiente metodología se realizó protegiendo al cultivo y el lisado celular de la luz. Se prepararon 100 ml de cultivo de *Escherichia coli* transformada con el plásmido *hrGFP-CBM26 $\times$ 3 pQE-31* en medio LB-amp 100  $\mu$ gml<sup>-1</sup> inducido a 0.6-0.7 DO<sub>600</sub> con 0.4 mM de IPTG e incubado a durante 8 h a 29°C y 150 rpm (New Brunswick Scientific Psychrotherm Edison N. J. USA). Las células fueron obtenidas por centrifugación a 21,000 $\times$ g y resuspendidas en 5 ml de tampón de lisis, tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 con tritón X-100 al 1% más lisozima 1 mgml<sup>-1</sup> e inhibidor de proteasas (Cocktail Sigma S8820 1X, 1:500), para obtener la fracción intracelular por sonicación en el equipo Vibra-Cell Sonics & Materials Inc., mediante 3 ciclos sucesivos de 15 y 20 seg a 60 Hz alternando con 1 min de enfriamiento en hielo. El lisado obtenido fue filtrado por una membrana de 0.22  $\mu$ m (Millipore) y puesto en contacto con 50 mg de almidón de maíz insoluble. Después de la interacción, el almidón fue lavado 3 veces con 1 ml tampón citrato-fosfato 0.1M pH 7.0 para eliminar cualquier proteína adsorbida inespecíficamente (Pérez, 2008). Finalmente, los gránulos de almidón con la proteína adsorbida fueron observados al microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX-51 utilizando un filtro FITC (Filtro de Isotiocianato) con una Cámara Olympus DP70 10 Mpx. Como control se empleó el mismo tratamiento con la proteína hrGFP sin CBMs fusionados.

### *Producción proteína hrGFP*

Se realizó un cultivo de 100 ml de *Escherichia coli* XL-10 Gold transformada con el plásmido *hrGFP-pQE-31* en medio LB-amp 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  inducido a 0.6-0.7  $\text{DO}_{600}$  con 0.4 mM de IPTG e incubado a durante 8 h a 29°C y 150 rpm (New Brunswick Scientific Psychrotherm Edison N. J. USA). Las células fueron obtenidas por centrifugación a 21,000 $\times g$  y resuspendidas en 5 ml de tampón de lisis, tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 con tritón X-100 al 1% más lisozima 1  $\text{mgml}^{-1}$  e inhibidor de proteasas (Cocktail Sigma S8820 1X, 1:500), para obtener la fracción intracelular por sonicación en el equipo Vibra-Cell Sonics & Materials Inc., mediante 3 ciclos sucesivos de 15 y 20 seg a 60 Hz alternando con 1 min de enfriamiento en hielo. El lisado obtenido fue filtrado por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) y puesto en contacto con 50 mg de almidón de maíz insoluble. Después de la interacción el almidón fue lavado 3 veces con 1 ml tampón citrato-fosfato 0.1M pH 7.0 para eliminar cualquier proteína adsorbida inespecíficamente (Pérez, 2008). Los gránulos de almidón tratados con esta proteína fueron observados al microscopio de fluorescencia descrito con anterioridad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura XII-A se observa el fragmento amplificado por PCR de aproximadamente 1,500 pb correspondiente al dominio catalítico (*La*DC). Aún cuando se partió de un DNA molde purificado y se probaron diferentes condiciones de amplificación, el *La*DC no fue obtenido con alta especificidad. El fragmento de DNA amplificado fue clonado en el vector pET-22b (Novagen) y expresado en *Escherichia coli* BL21(DE3). La proteína recombinante fue identificada mediante Western Blot con un anticuerpo anti-His (Roche), se observa en la figura XII-B. El *La*DC tienen un peso molecular de 58.1 kDa y migra entre las bandas de 53 y 78 kDa del marcador preteñido Broad-Range (Bio-Rad).



MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINS DPSKMKKKKSFVLSFLVIVASVFFISF  
 GFSNHSKQVAQAASDTTSTDHSSNDTADSVSDGVILHAWCWSFNTIKNNLKQIHDAGYTA  
 VQTSPVNEVKVNGSGSKSLNNWYWLYQPTKYSIGNYYLGTEAEFKSMCAAKEYNIRIIV  
 DATLNDTTSDYSAISDEIKSIPNWTGHNKQISNWSREDVDTQNSLLGLYDWNTQNSQVQT  
 YLKNYLERLISDGASGRYDAAKHIELPSQYDGSYGSNFWPNITDNGSEFQYGEVLQDSI  
 SKESDYANYMSVTASNYGNTIRNALKNRDFASTLQNFNISVPASKLVTWVESHNYAND  
 DQVSTWMNNSDIKLGWAVVASRSVPLFFDRPVDGGNGTRFPGSSEIGDAGSSLYYDKA  
 VVAVNKFHNAMAGQSEYISNPNGNTKIFENERGSKGVVFANASDSSYSLNVKTS LADGTY  
 ENKAGSDEFTVKNGLTGTIQGREVVVLYGDPNSSSVDKLAALAEHHHHHHH

Proteína: *La*DC  
 Aminoácidos: 528  
 Peso molecular: 58.1 kDa  
 pI: 5.45

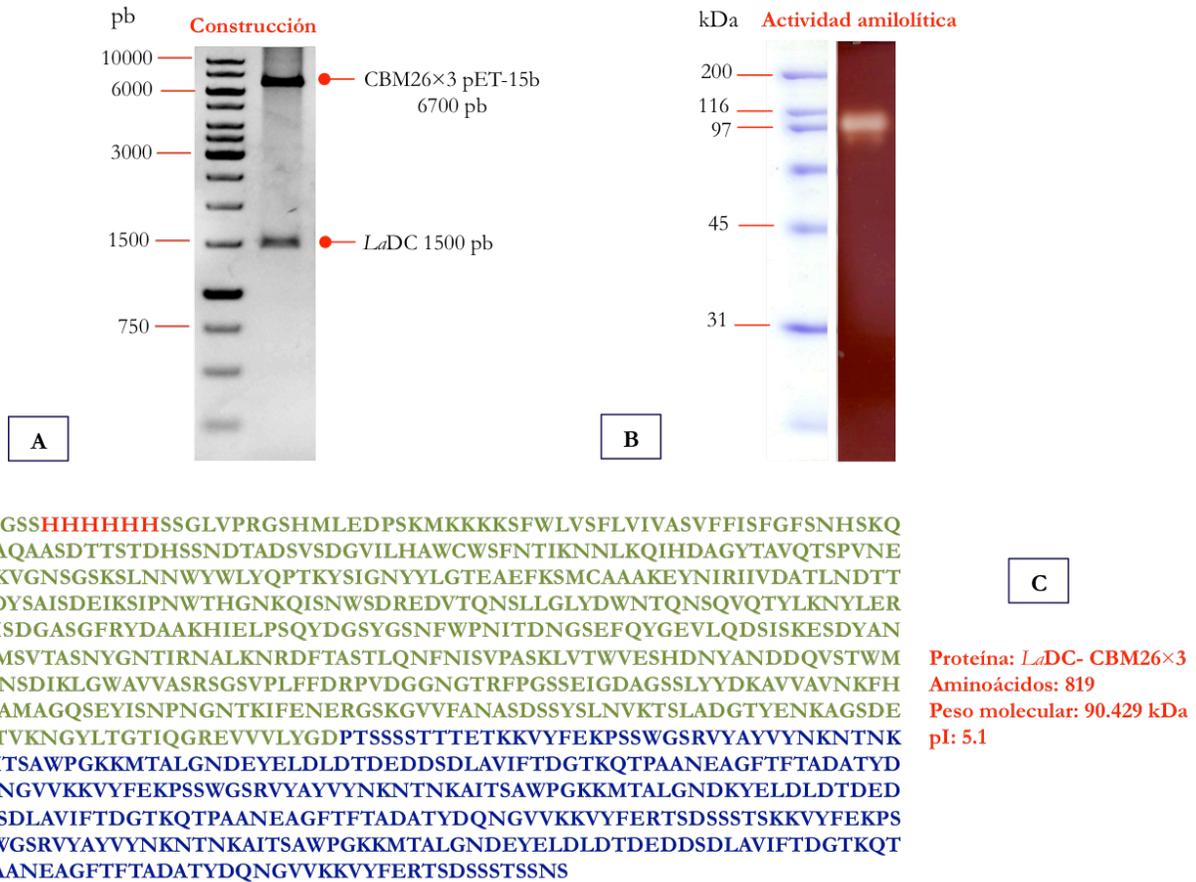
**Figura XII.** **A:** Amplificación del *La*DC por PCR, electroforesis en gel de agarosa al 1%; carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific); carril 2: *La*DC amplificado. **B:** Identificación de la expresión de la proteína *La*DC en *Escherichia coli* BL21(DE3) mediante el reconocimiento con un anticuerpo anti-His (Roche) **C:** Ensayo de actividad amilolítica en zimograma empleando almidón soluble al 1% como sustrato. **D:** Datos teóricos (ExPASy) y estructura primaria de la proteína *La*DC, en color rojo se observa el tallo de histidinas incluido por el vector hacia el carboxilo.

La actividad amilolítica fue comprobada en un zimograma usando almidón soluble como sustrato, en la figura XII-C se aprecia la banda traslúcida correspondiente. Se presenta además la estructura primaria de la proteína *LaDC* obtenida en ExPASy (<http://web.expasy.org/>), el tallo de histidinas proporcionado por el vector se localiza en el C-terminal y se encuentra indicado en rojo, figura XII-D. Estos resultados fueron el antecedente para la obtención de la proteína recombinante *LaDC*-CBM26×3.

En la figura XIII-A se muestra la construcción *LaDC*-CBM26×3 pET-15b digerida con *Bam*HI que libera el fragmento del *LaDC* ~1,500 pb, mientras que el fragmento de ~6,700 pb es el gen que codifica a los tres CBM26 más 5,708 pb del vector pET-15b. La construcción fue verificada por restricción y secuenciación.

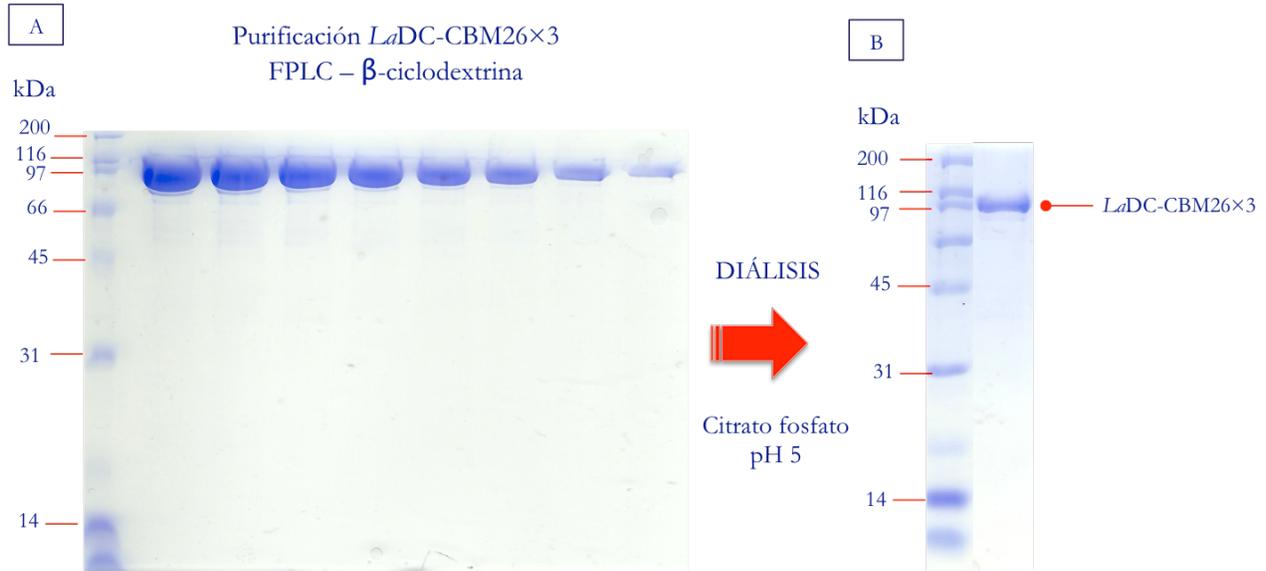
La expresión de la proteína *LaDC*-CBM26×3 no fue detectada mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-His (Roche). A menudo la baja o nula detección de la proteína por Western Blot es atribuida a errores en la metodología y el uso de reactivos, el uso de un control positivo puede descartar este tipo de aspectos; de igual forma, la disposición del epítopo en una proteína puede influir en la unión de anticuerpos (Jensen, 2012; Alegria-Schaffer *et al.* 2009). Es probable que el tallo de histidinas en la proteína *LaDC*-CBM26×3 no esté expuesto para ser reconocido por el anticuerpo. Así, el zimograma fue una herramienta importante para verificar la expresión de esta proteína, como se puede apreciar en la figura XIII-B, la proteína *LaDC*-CBM26×3 migra a la altura de 100 kDa del marcador de peso molecular Broad Range (Bio-Rad). En la misma figura se aprecian los valores teóricos obtenidos en ExPASy y la estructura primaria de la proteína, XIII-D.

**Proteína *La*DC-CBM26×3**



**Figura XIII.** Proteína *La*DC-CBM26×3. **A:** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, digestión *Bam*HI de la construcción *La*DC-CBM26×3 pET-15b y liberación del fragmento correspondiente al *La*DC~1500 pb. **B:** Zimograma empleando almidón soluble al 1% como sustrato para la identificación de actividad amilolítica de la proteína *La*DC-CBM26×3. **C:** Datos teóricos (ExPASy) y estructura primaria de la proteína. En rojo se presenta el tallo de histidinas proporcionado por el vector hacia el N-terminal, en verde la fracción correspondiente al *La*DC y en azul a los tres CBM26.

La afinidad por el almidón que le confieren tres módulos a la proteína *La*DC-CBM26×3 permiten una unión lo suficientemente estable para purificar a la proteína de fusión por cromatografía de afinidad a  $\beta$ -ciclodextrina en una columna de Sefarosa 6B epoxi-activada (16×35 mm) usando el sistema AKTA Prime GE Healthcare. La figura XIV-A muestra el análisis de las fracciones eluidas en la purificación de la proteína *La*DC-CBM26×3, los lavados durante este proceso fueron extendidos a 2 h manteniendo un flujo constante de 1 mlmin<sup>-1</sup>. En la figura XIV-B se evalúa a la proteína después de dializar, se observa la integridad y pureza para el uso posterior en experimentos de adsorción.



**Figura XIV. A:** Análisis de las fracciones obtenidas en la purificación de la proteína *LaDC-CBM26x3* por cromatografía de afinidad a  $\beta$ -ciclodextrina, SDS-PAGE 10%. **B:** Análisis de la proteína después de dializar en tampón citrato-fosfato 0.1M pH 5, SDS-PAGE 10%.

*Adsorción al almidón nativo: proteína LaDC-CBM26x3*

Los ensayos de adsorción al almidón insoluble se realizaron utilizando concentraciones crecientes de la proteína en una suspensión de almidón de maíz. La cantidad de proteína unida al almidón fue determinada por la diferencia entre la proteína total añadida y la proteína libre en solución ( $q_{ads} = q_{total} - q$ ). En la tabla VI se presentan los valores de proteína total añadida ( $q_{total}$ ), proteína libre ( $q$ ) y proteína adsorbida por mg de almidón ( $q_{ads}$ ).

Para determinar la constante de unión entre la proteína y el ligando, se linealizó (ver anexo) la ecuación tipo Michaelis-Langmuir (1) descrita en materiales y métodos, obteniéndose la ecuación (3). La isoterma fue linealizada graficando  $q/q_{ad}$  contra  $q$ . El coeficiente de correlación es mayor a 0.9 (figura XV).

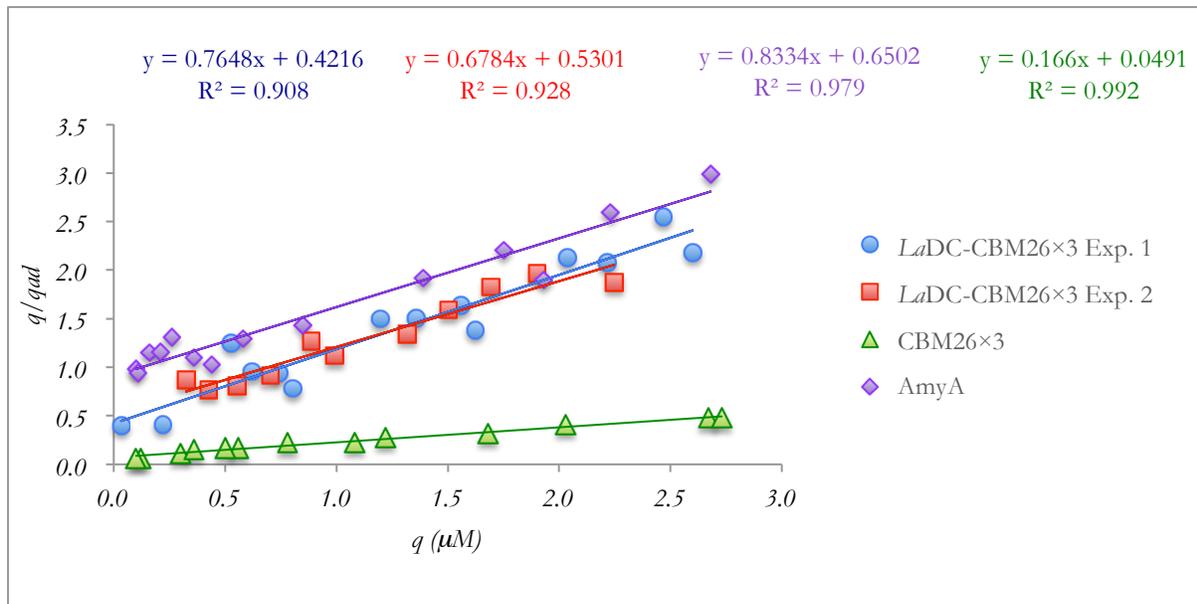
$$q/q_{ad} = (1/q_{max}) q + 1/K_p * q_{max} \dots \dots \dots (3)$$

**Tabla VI.** Datos obtenidos de los ensayos de adsorción de la proteína *LaDC-CBM26×3* sobre almidón de maíz insoluble.  $q_{total}$  = proteína total ( $\mu\text{M}$ ),  $q$  = proteína libre ( $\mu\text{M}$ ),  $q_{ad}$  = proteína adsorbida al gránulo de almidón ( $\mu\text{molmg}^{-1}$  de almidón),  $q/q_{ad}$  = proteína libre/proteína adsorbida al almidón. Se muestran los promedios de dos experimentos por triplicado.

	$q_{total}$ $\mu\text{M}$	$q$ $\mu\text{M}$	$q_{ad}$ $\mu\text{mol}$ proteína/mg almidón	$q/q_{ad}$
<b>Experimento 1</b>	0.545	0.221	0.541	0.409
	0.779	0.526	0.421	1.250
	1.012	0.621	0.652	0.953
	1.216	0.741	0.790	0.938
	1.419	0.803	1.026	0.782
	1.679	1.198	0.801	1.495
	1.899	1.358	0.901	1.507
	2.131	1.559	0.954	1.634
	2.332	1.625	1.177	1.381
	2.612	2.037	0.958	2.126
	2.858	2.217	1.068	2.077
	3.048	2.467	0.968	2.548
	3.315	2.599	1.193	2.179
<b>Experimento 2</b>	0.549	0.325	0.374	0.870
	0.759	0.426	0.555	0.767
	0.964	0.554	0.684	0.810
	1.163	0.702	0.768	0.915
	1.305	0.887	0.697	1.271
	1.524	0.992	0.886	1.119
	1.825	1.147	1.120	1.024
	1.905	1.317	0.980	1.344
	2.073	1.505	0.947	1.589
	2.250	1.694	0.927	1.826
	2.482	1.901	0.969	1.962
	2.776	2.011	1.270	1.583
	2.967	2.247	1.201	1.871

Los valores de  $K_p$  y  $q_{max}$  fueron calculados ajustando los datos de las isoterms a la ecuación 3 (Kyriacou & Neufeld, 1988). El valor de  $K_p$  ( $\mu\text{M}$ ) para la proteína que comprende tres CBM26 es  $3.378 \pm 0.001$ , mientras que *LaDC-CBM26×3* presenta una  $K_p$  de  $1.53 \pm 0.27$  y AmyA de  $1.282 \pm 0.004$ . De acuerdo a esta constante que mide la afinidad de la enzima por el sustrato, CBM26×3 es la proteína más afín al almidón de las tres comparadas, y sorprendentemente la adsorción de las proteínas *LaDC-CBM26×3* y AmyA es semejante.

Respecto a los valores de proteína máxima adsorbida ó  $q_{max}$  (Tabla VII), expresados en  $\mu$ moles de proteína adsorbidos por mg de almidón, parecen estar ligados a tamaño de la proteína, tomando en cuenta que la cantidad de proteína unida es directamente proporcional a la superficie disponible en el gránulo de almidón. Es decir, la proteína más pequeña de las evaluadas (CBM26 $\times$ 3) logra unir mayor cantidad de moles en una superficie constante de almidón que proteínas de mayor tamaño como *La*DC-CBM26 $\times$ 3 y AmyA. Los valores de  $q_{max}$  y  $K_p$  se resumen en la tabla VII.

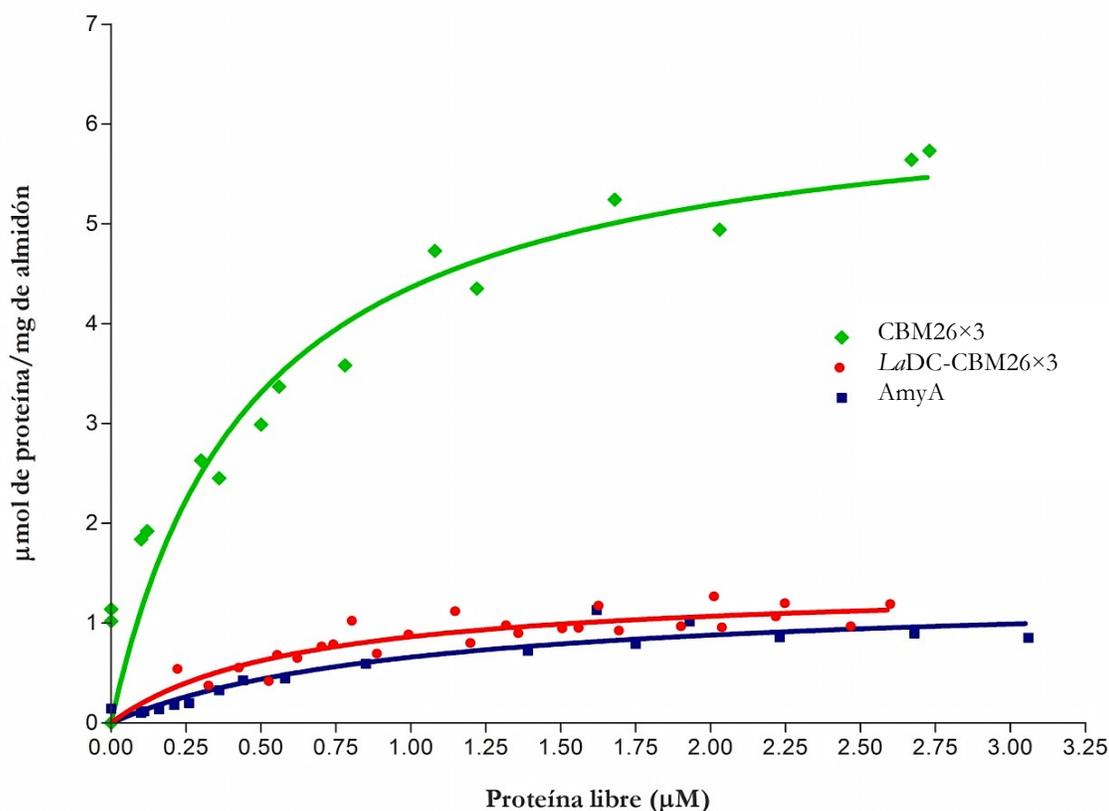


**Figura XV.** Análisis lineal de la adsorción al almidón de la proteína *La*DC-CBM26 $\times$ 3 (azul y rojo); y proteínas AmyA (morado) y CBM26 $\times$ 3 (verde). Se presenta el gráfico de proteína libre ó  $q$  ( $\mu$ M) contra proteína libre/ $\mu$ moles de proteína adsorbida por mg de almidón ( $q / q_{ad}$ ).

**Tabla VII.** Parámetros de unión obtenidos ajustando los datos de las isothermas a la ecuación (3). Proteínas CBM26 $\times$ 3, AmyA y *La*DC-CBM26 $\times$ 3.

Proteína	$K_p$ $\mu$ M	$q_{max}$ $\mu$ mol proteína $mg^{-1}$ almidón
CBM26 $\times$ 3	$3.378 \pm 0.001$	$6.020 \pm 0.002$
<i>La</i> DC-CBM26 $\times$ 3	$1.53 \pm 0.27$	$1.40 \pm 0.09$
AmyA	$1.282 \pm 0.004$	$1.20 \pm 0.004$

En la figura XVI se muestra el comportamiento de adsorción no lineal de las proteínas *LaDC-CBM26×3*, *AmyA* y *CBM26×3*. El gráfico se construyó tomando en cuenta la concentración de proteína libre o no adsorbida en el equilibrio ( $\mu\text{M}$ ) como variable independiente y la cantidad de proteína adsorbida por mg de almidón como variable dependiente. El cambio en la pendiente de la curva hacia la formación de una meseta indica la saturación del sustrato, esto en función del aumento en la concentración de proteína añadida. La  $K_d$  (2) calculada representa la concentración de proteína libre a la que se tiene la mitad de la máxima adsorción, expresada en términos de la variable independiente. De tal forma que, mientras mayor sea la afinidad de la proteína por el sustrato, existe menor concentración de proteína libre en el equilibrio y menor es el valor de  $K_d$ .



**Figura XVI.** Isotermas de adsorción considerando a la proteína libre después del equilibrio. Los valores de  $K_d$  ( $\mu\text{M}$ ) obtenidos son: ■  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (*AmyA*)  $K_d = 0.86 \pm 0.01$ ; ■ *LaDC-CBM26×3*  $K_d = 0.66 \pm 0.07$ ; ■ *CBM26×3*  $K_d = 0.43 \pm 0.04$ . Datos crudos de *CBM26×3* y *AmyA* tomados de Guillén *et al.* 2007.

Como se puede observar en la figura XVI, las proteínas AmyA y *LaDC*-CBM26×3 presentan un comportamiento de adsorción semejante entre ellas y notoriamente diferente al de tres módulos (CBM26×3). El valor de  $K_d$  obtenido para la proteína *LaDC*-CBM26×3 es  $0.66 \pm 0.07$ , mientras que para CBM26×3 es de  $0.43 \pm 0.04$  y AmyA de  $0.86 \pm 0.16$ . Los coeficientes de correlación en todos los casos son mayores a 0.9. El valor más bajo de  $K_d$  es de la proteína formada por tres módulos (CBM26×3), de acuerdo a este análisis es la proteína más afín al almidón de las tres comparadas.

Es importante tomar en cuenta que los moles de proteína unida a una superficie constante de almidón dependen del tamaño de la proteína, observándose así un decremento en el valor de  $B_{max}$  ( $\mu\text{mol}$  de proteína adsorbida  $\text{mg}^{-1}$  de almidón) con el incremento del peso molecular. El valor de  $B_{max}$  calculado para cada proteína se presenta en la tabla VIII, en donde se aprecia la relación de los valores de  $B_{max}$  con el tamaño de la proteína, así el valor de  $B_{max}$  para *LaDC*-CBM26×3 es intermedio al de CBM26×3 y AmyA.

**Tabla VIII.** Parámetros de unión obtenidos ajustando los datos de las isotermas a la ecuación (2). Proteínas CBM26×3, AmyA y *LaDC*-CBM26×3.

Proteína	$K_d$ $\mu\text{M}$	$B_{max}$ $\mu\text{mol}$ proteína $\text{mg}^{-1}$ almidón
CBM26×3	$0.43 \pm 0.04$	$6.23 \pm 0.26$
<i>LaDC</i> -CBM26×3	$0.66 \pm 0.07$	$1.38 \pm 0.09$
AmyA	$0.86 \pm 0.16$	$1.22 \pm 0.07$

Para analizar las pequeñas diferencias en la adsorción al almidón de las enzimas AmyA y *LaDC*-CBM26×3, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba “t- de student” de los parámetros de unión obtenidos. De acuerdo al análisis de este número de datos, se determinó que no hay diferencia significativa entre el comportamiento de adsorción de ambas proteínas.

Si se observan las constantes  $K_p$  y  $K_d$  obtenidas a partir de los modelos descritos con anterioridad (Tabla VII y VIII), la proteína *LaDC-CBM26*×3 no muestra valores de afinidad iguales o altamente cercanos a los obtenidos para la proteína *CBM26*×3. Esto insinúa (como sucede en *AmyA*) que no todos los CBMs que forman a esta enzima interactúan simultáneamente con el almidón en el proceso de adsorción. De acuerdo con estas constantes, la interacción de *AmyA* y *LaDC-CBM26*×3 con el almidón insoluble está soportada por menos de tres módulos.

Cuando se observó el comportamiento de adsorción de la amilasa nativa (*AmyA*) en el estudio de Guillén *et al.* 2007, surgieron dos hipótesis al respecto. Una de ellas es que los cinco CBMs presentes en *AmyA* no interactúan simultáneamente en el fenómeno de adsorción debido a un impedimento estérico por parte del *LaDC*. La segunda hipótesis es que parte de la estructura del *LaSBD* funge como un espaciador, ya que en glucoamilasas (Shu-Chuan *et al.* 2007) y celulasas (Beckham *et al.* 2010) se han observado regiones espaciadoras de considerable movilidad que conectan al dominio catalítico con el CBM. Estas regiones son importantes debido a que median la unión al sustrato (Williamson *et al.* 1992) y son abundantes en cierto tipo de residuos (S, T y P). *AmyA* posee dos regiones ricas en S y T que flanquean al *LaSBD*, no obstante, son pequeñas para ser consideradas como espaciadoras. Si alguno(s) de los *CBM26* en *AmyA* fungiera(n) como un espaciador, se esperaría que la constante que mide la afinidad de la proteína por el sustrato de *LaDC-CBM26*×3 presentara un valor menor a la encontrada para *AmyA*.

Indudablemente la presencia de tandemes de CBMs en glucósido hidrolasas es una respuesta evolutiva que favorece el aprovechamiento de polisacáridos. La presencia de múltiples CBMs es frecuente en GHs de organismos que crecen en ambientes con altas temperaturas, por lo que se ha propuesto que representa una respuesta evolutiva para compensar la pérdida de afinidad debido a la temperatura; estudios en enzimas de organismos termófilos muestran efectos sinérgicos en la adsorción al sustrato, además de que pueden conferir especificidad hacia otros sustratos.

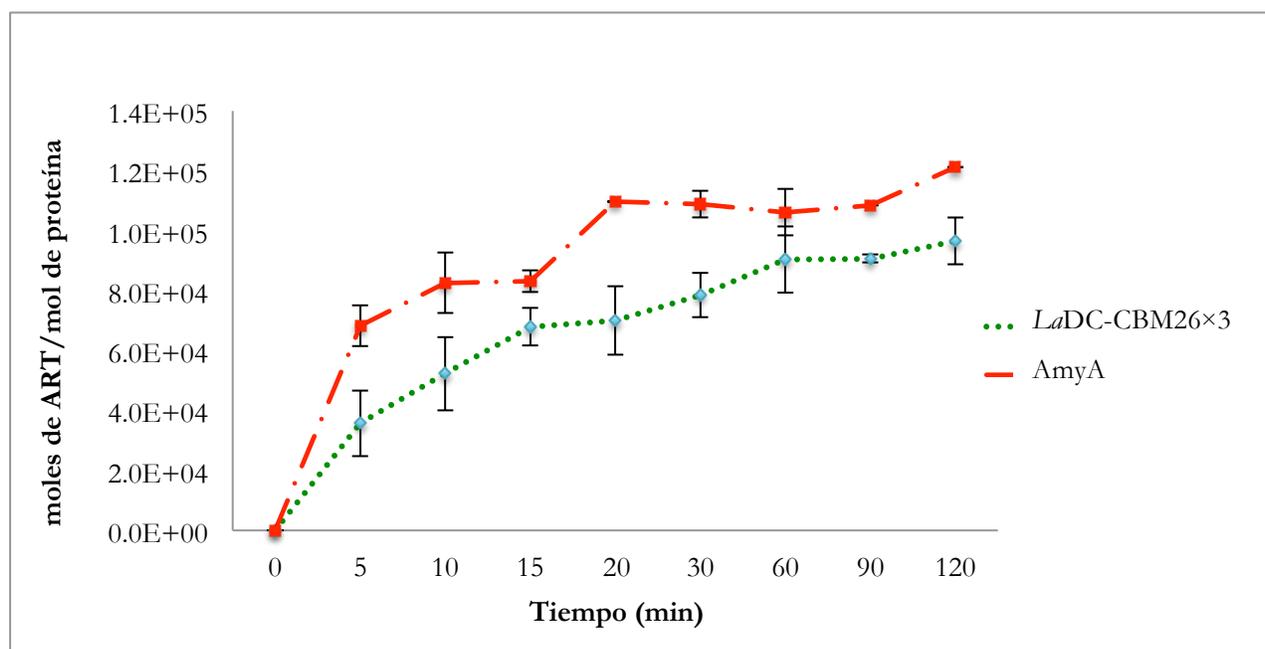
En el triplete de CBM6 de la xilanasas de *Clostridium stercorarium*, que no son idénticos en secuencia, se encontró que cada unidad puede otorgar diferente especificidad de unión y que combinaciones en tándem de estos módulos se unen cooperativamente a polisacáridos, incrementando de 20 a 40 veces la afinidad de los módulos individuales (Boraston *et al.* 2002). Algunos ejemplos de proteínas termoestables con más de un CBM en sus estructura son: la xilanasas de *Rhodothermus marinus* con dos CBM4 (Abou Hachem *et al.* 2000), xilanasas 11A de *Cellulomonas fimi* con dos CBM2 (Bolam *et al.* 2001), *Acidothermus cellulolyticus* 11B que produce varias GHs putativas con CBMs en tándem (Barabote *et al.* 2009), entre otras. Así, la baja afinidad de los dominios individuales se ve aumentada varias veces debido a las interacciones multivalentes de la proteína con el sustrato (Boraston *et al.* 2002).

#### *Hidrólisis: proteína LaDC- CBM26×3*

En este estudio, la capacidad hidrolítica de AmyA y la  $\alpha$ -amilasa con tres módulos de unión a carbohidrato (*LaDC-CBM26×3*) fue examinada en almidón soluble por el método yodo-yoduro y en almidón insoluble por la liberación de azúcares reductores a través del método DNS. En ambas enzimas, la hidrólisis del almidón fue acompañada de una rápida reducción en la capacidad de tinción con yodo y una correspondiente liberación de azúcares reductores. Las actividades específicas encontradas sobre almidón de maíz soluble son: AmyA  $3,900 \pm 100 \text{ U mg}^{-1}$ , mientras que para *LaDC-CBM26×3* es  $2,900 \pm 200 \text{ U mg}^{-1}$ .

Con base en los resultados de DNS, AmyA libera en promedio 1.5 veces más azúcares reductores que la amilasa con tres módulos (Figura XVII), por lo que se sugiere que AmyA es más eficiente en la degradación del sustrato insoluble. En el gráfico de la figura XVII se observa que la mayor diferencia en la actividad amilolítica de ambas enzimas podría presentarse en los primeros cinco minutos de reacción, si se observan las pendientes a partir de este punto, la eficiencia no parece distante. Estudios de cinética enzimática deben fortalecer este aspecto del estudio.

Rodríguez-Sanoja *et al.* en el año 2000 evaluó la eficiencia de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y *L. plantarum* para hidrolizar almidón insoluble, así como la capacidad de adsorción al sustrato. Ambas enzimas poseen CBMs en tándem de la misma familia, cinco y cuatro correspondientemente. La conclusión de este estudio es que la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* es en promedio 10 veces más eficiente que la enzima de *L. plantarum* para hidrolizar el sustrato insoluble, mientras que solo existe una pequeña diferencia en la capacidad de unión al sustrato. La ausencia de dos CBMs en la proteína LaDC-CBM26 $\times$ 3 no afecta el comportamiento de adsorción sobre almidón nativo, sin embargo, parece disminuir la actividad amilolítica, respecto a AmyA. Es probable que presencia de múltiples CBMs en AmyA incida mayoritariamente en la actividad hidrolítica de la enzima.

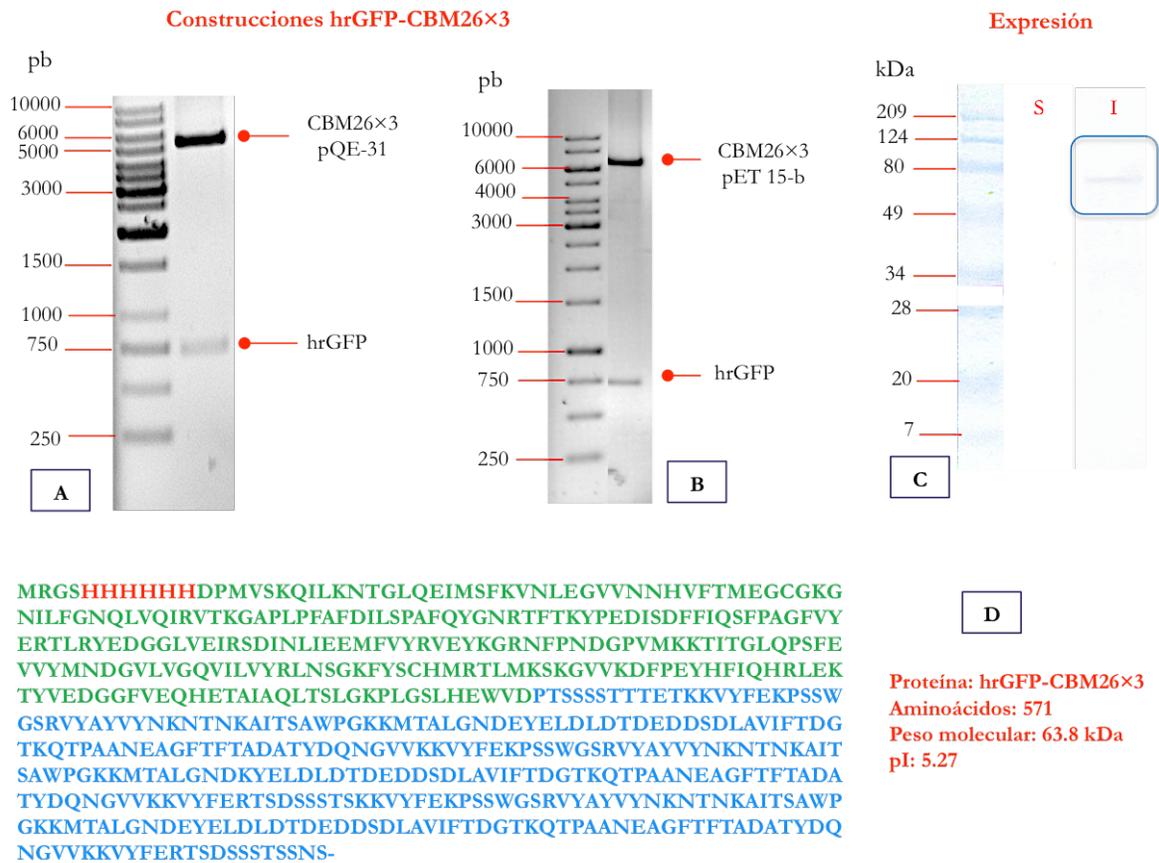


**Figura XVII.** Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS liberados por las proteínas AmyA y LaDC-CBM26 $\times$ 3.

### Proteína hrGFP-CBM26 $\times$ 3

Para establecer si tres CBMs son suficientes para transferir la capacidad de adsorción al almidón a una proteína no relacionada, se construyó la proteína hrGFP-CBM26 $\times$ 3. La proteína hrGFP-CBM26 $\times$ 3 se obtuvo en dos sistemas de expresión pQE-31 y pET-15b,

debido a la baja producción observada. En la figura XVIII se presenta la digestión *Bam*HI de ambas construcciones, en las que se libera el fragmento correspondiente a *hrGFP* de aproximadamente 750 pb. En la parte inferior de la misma figura XVIII se aprecia la estructura primaria de la proteína *hrGFP-CBM26*×3 construida en el vector pQE-31, en el extremo amino se marca en color rojo el tallo de histidinas, seguido de *hrGFP* (verde) y los residuos de los tres módulos *CBM26* (azul).

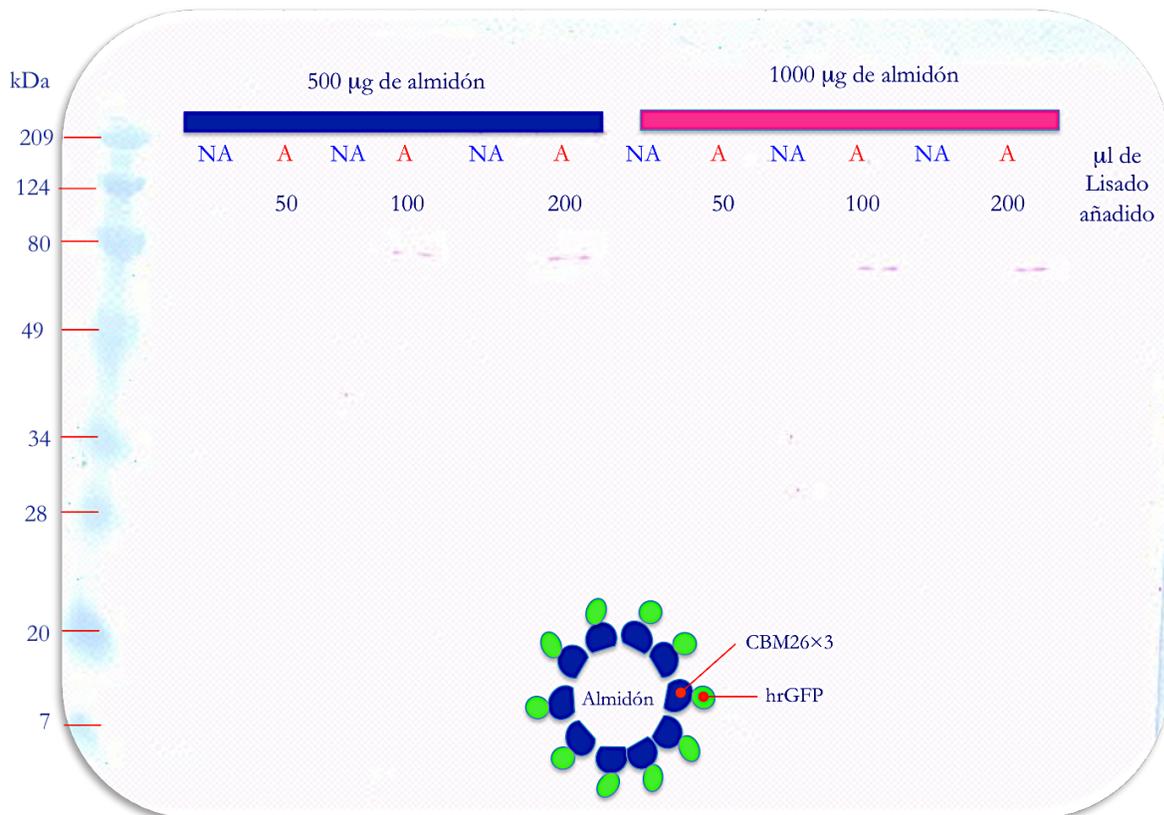


**Figura XVIII.** **A:** Construcción *hrGFP-CBM26*×3 pQE31, digestión *Bam*HI que libera al fragmento correspondiente a *hrGFP*; **B:** *hrGFP-CBM26*×3 pET-15b, digestión *Bam*HI. **C:** Expresión *hrGFP-CBM26*×3, S-fracción soluble y I-fracción insoluble. **D:** Estructura primaria de la proteína y datos teóricos (ExPASy). Hacia el amino se marca en rojo el tallo de histidinas, seguido del gen *hrGFP* (verde) y los residuos de los tres módulos *CBM26*×3 (azul).

A pesar del uso de señales fuertes de transcripción y traducción, de la variación de las condiciones de expresión (tiempo y temperatura de inducción, concentración del inductor y cepa huésped) así como la verificación de integridad del promotor T5 en el plásmido *hrGFP-CBM26*×3 pQE31, la expresión de proteína fue baja, además de observarse

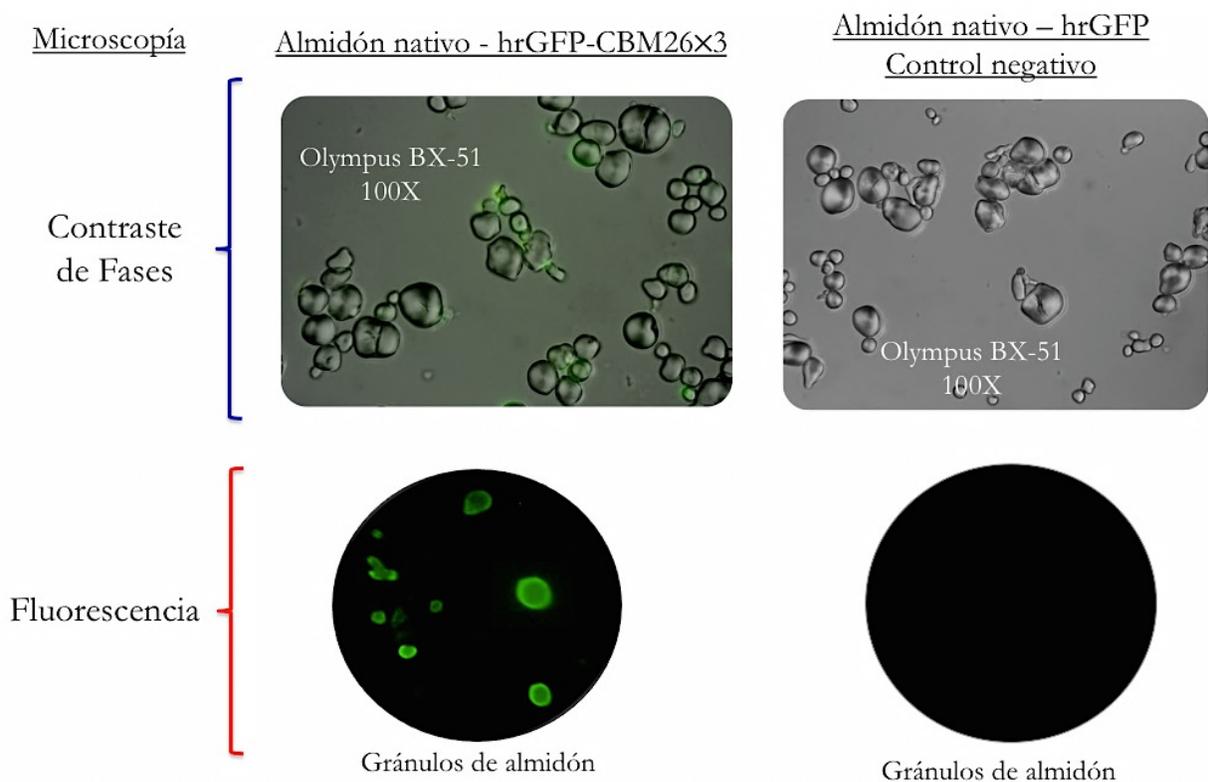
mayoritariamente en la fracción insoluble (Figura XVIII-C). La baja expresión de una proteína es multifactorial, puede ser afectada por las condiciones de cultivo y el sistema de expresión, así como por la codificación del gen recombinante diferente al de la célula huésped y la inestabilidad del RNA mensajero (aspecto no evaluado).

La poca proteína soluble hrGFP-CBM26×3 fue empleada para realizar ensayos cualitativos de adsorción al almidón nativo. El primer ensayo consistió en incubar diferentes volúmenes de lisado celular en presencia de almidón de maíz nativo Sigma-Aldrich S4180-500G (500 y 1000 µg). Las fracciones de proteína eluida y proteína no adsorbida (recuperada después de incubar el lisado con el almidón) fueron analizadas mediante Western Blot empleando un anticuerpo anti-His (Roche). En la imagen de la figura XIX se aprecia el reconocimiento de la proteína en las fracciones eluidas, en un peso aproximado de 80 kDa.



**Figura XIX.** Ensayo cualitativo de adsorción de la proteína hrGFP-CBM26×3 al almidón insoluble. Western Blot empleando un anticuerpo anti-His (Roche). A: proteína adsorbida (fracción eluida), NA: proteína no adsorbida (sobrenadante). En la parte inferior se ilustra la adsorción de la proteína hrGFP-CBM26×3 al gránulo de almidón.

En el segundo ensayo, la presencia de la proteína hrGFP-CBM26×3 adsorbida al gránulo de almidón fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia. En la figura XX se presenta la micrografías de los gránulos en contraste de fases y fluorescencia. El gránulo fluorescente prueba la adsorción de la proteína hrGFP-CBM26×3 al gránulo de almidón, a causa de hrGFP. Como control negativo, se produjo a la proteína hrGFP (sin módulos CBM26) y se dispuso el mismo método que para la proteína hrGFP-CBM26×3; se puede notar que la proteína hrGFP no se une por sí sola al almidón, de manera que el gránulo no fluoresce.



**Figura XX.** Microscopía de fluorescencia y contraste de fases. Observación de los gránulos de almidón de maíz nativo Sigma-Aldrich (S4180-500G) con la proteína hrGFP-CBM26×3 adsorbida. El control negativo demuestra que hrGFP no se une por sí sola al gránulo de almidón.

Los ensayos cualitativos de adsorción evidenciaron la funcionalidad de tres CBM26 para adsorber una proteína no relacionada al gránulo de almidón, además de no interferir con el plegamiento funcional de la misma.

## CONCLUSIONES

- ▮ Estudios previos establecieron que el SBD de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* confiere la capacidad a una proteína no relacionada de unirse al gránulo de almidón sin afectar la estructura de la proteína fusionada. En el presente trabajo se demostró la funcionalidad de un SBD formado por tres CBM26 para inmovilizar y purificar a las proteínas hrGFP y LaDC sobre almidón de maíz nativo, asimismo, se estableció que la fusión de este número de módulos al LaDC habilita la hidrólisis del sustrato insoluble.
- ▮ La ausencia de dos módulos de unión a carbohidrato en la proteína LaDC-CBM26×3 no afecta la afinidad por el sustrato insoluble ya que no hay diferencia significativa entre los parámetros de unión de AmyA y LaDC-CBM26×3. El comportamiento de adsorción y las constantes calculadas sugieren que son menos de tres CBMs en las enzimas AmyA y LaDC-CBM26×3 los que soportan la interacción con el sustrato insoluble.
- ▮ Con base en la cantidad de azúcares reductores liberados por las enzimas y cuantificados mediante la técnica DNS, se sugiere que AmyA es más eficiente que LaDC-CBM26×3 en la degradación del sustrato insoluble. En este sentido, es probable que la presencia de múltiples CBMs en AmyA incida mayoritariamente en la actividad hidrolítica de la enzima.
- ▮ Los hallazgos del presente estudio contribuyen a entender la manera en que la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, enzima de estructura poco usual, interacciona con el sustrato insoluble; al mismo tiempo que se benefician las aplicaciones biotecnológicas que se desarrollan en torno al LaSBD.

## PERSPECTIVAS

- ~ Obtener y comparar los parámetros cinético-enzimáticos ( $K_{cat}$ ,  $K_M$ ) de las proteínas *LaDC*-CBM26×3 y *AmyA*.
- ~ Construir y evaluar la adsorción del *LaDC* unido a dos y cuatro CBM26 de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

## REFERENCIAS

- Ω **Abe A., Tonozuka T., Sakano Y. & Kamitori S. (2004).** Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *Journal of Molecular Biology*. 335:811–822.
- Ω **Abou M., Nordberg E., Bartonek E., Raghothama S., Simpson P., Gilbert H., Williamson M. & Holst O. (2000).** Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochemical Journal*. 345: 53-60.
- Ω **Aguilera P. (2012).** Inmovilización del fragmento C de la toxina del tétanos a gránulos de almidón. Tesis de Licenciatura. México. UNAM.
- Ω **Alegria-Schaffer A., Lodge A. & Vattem K. (2009).** Performing and optimizing western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in Enzymology*. 463: 573-599.
- Ω **Barabote R., Xie G., Leu D., Normand P., Necsulea A., Daubin V., Médigue C., Adney W., Clare X., Lapidus A., Parales R., Detter C., Pujic P., Bruce D., Lavire C., Challacombe J., Brettin T. & Berry A. (2009).** Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidotherrmus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Research*. 19:1033-1043.
- Ω **Beckham G., Bomble Y., Matthews J., Taylor C., Resch M. Yarbrough J., Decker S., Bu L., Zhao X., McCabe C., Wohler J., Bergentrahle M., Brady J., Adney W., Himmel M., Crowley M. (2010).** The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* Family 7cellulase is a flexible, disordered protein. *Biophysical Journal*. 99(11): 3773-81.
- Ω **BeMiller J. & Whistler R. (2009).** Starch: Chemistry and Technology. Third Edition. Food Science and Technology International Series. Academic Press. Elsevier.
- Ω **Bertolini A. (2010).** Starches: Characterization, properties and applications. CRC Press Taylor & Francis Group. Pp. 33-36.
- Ω **Bolam D., Xie H., White P., Simpson P., Hancock S., Williamson M. & Gilbert H. (2001).** Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochemistry*. 40:2468–2477.
- Ω **Boraston A., McLean B., Chen G., Li A., Warren R. & Kilburn D. (2002).** Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase, *Molecular Microbiology*. 43(1): 187-194.
- Ω **Boraston A., Bolam D., Gilbert H. & Davies G. (2004).** Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*. 382 (3): 769–781.
- Ω **Boraston A., Healey M., Klassen J., Ficko-Blean E., Van Bueren A. & Law V. (2006).** A structural and functional Analysis of  $\alpha$ -Glucan Recognition by family 25 and 26 Carbohydrate-binding Modules Reveals a Conserved Mode of Starch Recognition. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(1): 587-598.
- Ω **Cantarel B., Coutinho P., Rancurel C., Bernard T., Lombard V & Henrissat B. (2009).** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 37:233-238.
- Ω **Copeland L., Blazek J., Salman H. & Chiming M. (2009).** Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 23: 1527-1534.
- Ω **Curá J., Jansson P. & Krisman C. (1995).** Amylose is not strictly linear. *Starch/Staerke*. 47:207-209.
- Ω **Frankel S., Sohn R. & Leinwand L. (1991).** The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 1192-1196.
- Ω **Fennema O. (1985).** Food Chemistry. O. R. Fennema, Ed. Marcel Dekker, New York. Pp: 23-67.
- Ω **Giraud E., & Cuny G. (1997).** Molecular characterization of the  $\alpha$ -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 Journal*. 198: 149-157.

- Ω **Giraud E., Gosselin L., Marin B., Parada J. & Raimbault. (1993).** Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 276-282.
- Ω **Gourlay K., Arantes V. & Saddler J. (2012).** Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*. 5:5.
- Ω **Gilkes R., Jarvis E., Henrissat B., Tekant B., Miller C., Warren A., & Kilburn G. (1992).** The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 6743–6749.
- Ω **Guillén D., Moreno-Mendieta S., Aguilera P., Sánchez S., Farres A. & Rodríguez-Sanoja R. (2013).** The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97:4141-4148.
- Ω **Guillén D., Sánchez S. & Rodríguez-Sanoja R. (2010).** Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology Biotechnology*. 85:1241-1249.
- Ω **Guillén D., Santiago M., Linares L., Pérez R., Ruiz B., 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.
- Ω **Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. & Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 11(30): 1599-1616.
- Ω **Henrissat B. (1991).** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. 280: 309-316.
- Ω **Horváthová V., Janecek S. & Sturdik E. (2001).** Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of their Properties. *General Physiology and Biophysics*. 20:7-32.
- Ω **Jensen C. (2012).** The Basics of Western Blotting. *Anatomical Record*. 295(3): 369-371.
- Ω **Juge N., Le Gal-Coëffet M., Furniss C., Gunning A., Kramhøft B., Morris V., Williamson G. & Svensson B. (2002).** The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis. *Biologia Bratislava*. 11: 239-245.
- Ω **Kyriacou, A. & Neufeld R. (1988).** Effect of physical parameters on the adsorption characteristics of fractionated *Trichoderma reesei* cellulase components. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 675-681.
- Ω **Laemmli U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Ω **Lee I., Evans B. & Woodward J. (2000).** The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 82(1–4):121–213.
- Ω **Linder M. & Teeri T. (1997).** The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology* 57: 15–28.
- Ω **McCartney L., Gilbert J., Bolam N., Boraston B. & Knox P. (2004).** Glycoside hydrolase carbohydrate modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Analytical Chemistry*. 326: 49-54.
- Ω **Miller G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Ω **Miyawaki A. (2002).** Green Fluorescent Protein-like Proteins in Reef Anthozoa Animals. *Cell Structure and Function*. 27:343-347.2
- Ω **Monteiro P. & de Oliveira P. (2010).** Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry—A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:850-861.
- Ω **Moreno-Mendieta S., Guillén D., Espitia C., Hernández-Pando R., Sánchez S. & Rodríguez-Sanoja R. (2014).** A novel antigen-carrier system: The Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 474: 241-248.

- Ω **Najmudin S., Guerreiro C., Carvalho A., Prates J., Correia M., Alves V., Ferreira L., Romao M., Gilbert H., Bolam D. & Fontes C. (2006).** Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with  $\beta$ -glucan chains. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(13): 8815-8828.
- Ω **Nakamura L. (1981).** *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31(1): 56-63.
- Ω **Nikuni Z. (1978).** Studies on starch granules. *Starch*. 30:105.
- Ω **Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D. & Mohan R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 31:135-152.
- Ω **Pérez R. (2008).** Construcción de una proteína de fusión utilizando el dominio de fijación al almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* como tallo de purificación. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Ω **Robin J., Mercier C., Charbonniere R. & Guilbot A. (1974).** Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*. 51:389-406.
- Ω **Rodríguez-Sanoja R., Morlon-Guyot J., Jore J., Pintado J., Juge N. & Guyot P. (2000).** Comparative characterization of Complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Applied and environmental Microbiology*. 66(8): 3350-3356.
- Ω **Rodríguez-Sanoja R., Ruíz B., Guyot P. & Sánchez S. (2005b).** Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -Amylases. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 297-302.
- Ω **Rodríguez-Sanoja R., Oviedo N., Escalante L., Ruíz B. & Sánchez S. (2009).** A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36: 341-346.
- Ω **Rodríguez-Sanoja R., Oviedo N. & Sánchez S. (2005a).** Microbial starch-binding domain. *Current Opinion Microbiology*. 8(3): 260-267.
- Ω **Sambrook J., Fritsch F. & Maniatis T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Michigan.
- Ω **Santiago M., Linares L., Sánchez S. & Rodríguez-Sanoja R. (2005).** Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *Biologia, Bratislava*. 16:111-114.
- Ω **Shoseyov O., Shani Z. & Levy I. (2006).** Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. American Society for Microbiology. Pp. 283-295.
- Ω **Simonian M. (2002).** Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in food analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. Incorporation. B: B1: B1.3.
- Ω **Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Madhavan K., Soccol C. & Pandey A. (2006).**  $\alpha$ -amylases from Microbial Sources- An Overview on Recent Developments. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2): 173-184.
- Ω **Sorimachi K., Le Gal-Coëffet M., Williamson G., Archer D., Williamson M. (1996).** Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to  $\beta$ -cyclodextrin. *Structure*. 5: 647-661.
- Ω **Southall S., Simpson P., Gilbert H., Williamson M. & Williamson M. (1999).** The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *Federation of European Biochemical Societies*. 447:58-60.
- Ω **Stewart E., Aslund F. & Beckwith J. (1998).** Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO Journal*. 17(19): 5543-5550.
- Ω **Su-Chuan L., Wei-Ting L., Shi-Hwei L., Wei-I C., Bor-Kai H., I-Ping L., Chia-Chin S. & Dah-Tsy M. (2007).** Role of the linker region in the expression of *Rhizopus oryzae* glucoamylase. *BMC Biochemistry*. 8:9.
- Ω **Sudha. (2012).** Effect of different concentrations of metal ions on alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Research in Biotechnology*. 3(4): 67-71.

- Ω **Su X., Mackie R. & Cann I. (2012).** Biochemical and mutational Analyses of a Multidomain Cellulase/mannanase from *Caldicellulosiruptor bescii*. Applied and Environmental Microbiology. 78(7): 2230-2240.
- Ω **Tester F., Karkalas J., Qi X. (2004).** Starch–composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science. 39: 151-165.
- Ω **Tsien Y. (1998).** The green fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry. 67:509-44.
- Ω **Vagenende V., Yap M. & Trout B. (2009).** Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. Biochemistry. 48: 11084-11096.
- Ω **Van der Maarel M., van der Veen B., Uitdehaag J., Leemhuis H. & Dijkhuizen. (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. Journal of Biotechnology. 94:137-155.
- Ω **Várnai A., Siika-aho M. & Viikari L. (2013).** Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. Biotechnology for Biofuels. 6:30.
- Ω **Voet D. y Voet G. (2006).** Bioquímica. 3a edición. Médica panamericana. Argentina. Pp. 218-219.
- Ω **Williamson G., Belshaw N. & Williamson P. (1992).** O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. Conformation and role in binding. Biochemical Journal. 282: 423-428.
- Ω **Yoshida S., Mackie R. & Cann I. (2010).** Biochemical and Domain Analyses of FSUAxe6B, a Modular Acetyl Xylan Esterase, Identify a Unique Carbohydrate Binding Module in *Fibrobacter succinogenes* S85. Journal of Bacteriology. 192 (2): 483-493.

# A NEXO

## I. Proteína verde fluorescente

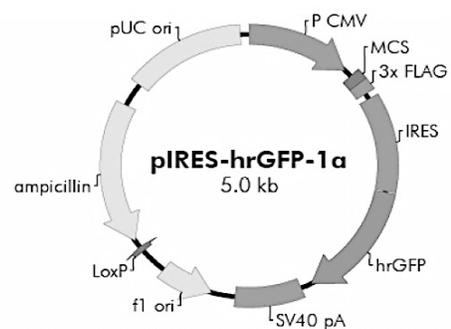
Las proteínas verde fluorescente de organismos bioluminiscentes se han convertido en una herramienta importante en los campos de biología celular y molecular para monitorear la expresión y localización de proteínas. En el medio natural, la proteína verde fluorescente absorbe la energía de emisión primaria generada por la aequorina y luciferasa para después emitir luz verde, que tiene un mayor alcance en el ambiente marino (Miyawaki, 2002; Tsien, 1998).

La proteína verde fluorescente utilizada en el presente trabajo, se amplificó a partir del vector pIRES-hrGFP-1<sup>a</sup> (Pérez, 2008) y proviene del organismo marino *Renilla reniformis*. Esta proteína es un monómero con un peso aproximado de 30 kDa, posee un coeficiente de extinción de 2.5 mayor que EGFP (*Enhanced Green Fluorescent protein*) de *Aequorea victoria*, también tiene mayor resistencia a cambios estructurales inducidos por el pH y es más resistente a solventes orgánicos, detergentes y proteasas. Adicionalmente hay datos que indican que hrGFP es menos tóxica que EGFP en algunas líneas celulares. La hrGFP posee un pico de excitación de 500 nm y un pico de emisión de 506 nm, los cuales pueden detectarse con longitudes de onda igual a los utilizados con la EGFP (Stratagene, 2013).

La utilidad de GFP como un marcador biológico deriva del hecho que el gen de GFP contiene toda la información necesaria para formación postraduccional del cromóforo, no requiere enzimas específicas del organismo, es decir, la fluorescencia de la proteína no requiere otro cofactor. El fluoróforo formado a partir de la ciclación de la cadena principal del péptido. Esta característica hace a la molécula virtualmente un indicador no obstrusivo de la posición de la proteína en las células. En efecto, el uso de GFP como etiqueta sugiere que la proteína no altera la función normal o localización de la proteína fusionada. La permeabilización y fijación del sustrato no son necesarias para localizar a GFP, proteínas, organelos y células marcadas con esta proteína pueden ser examinadas en tejido vivo. Esta habilidad para examinar procesos en células vivas ha permitido a los biólogos estudiar las dinámicas celulares y desarrollar procesos en tejidos intactos.



**Figura.** Crystal Structure of Monomeric Kusabira-Orange (MKO), Orange-Emitting GFP-like Protein, at pH 7.5.  
DOI:10.2210/pdb3mgf/pdb



Vector pIRES-hrGFP-1<sup>a</sup>. A partir del cual se amplificó el gen hrGFP.

## II. Linealización de la ecuación de Michaelis Langmuir (Kyriacou *et al.* 1988)

$$\begin{aligned}
 q_{ad} / q &= K_p \times q_{max} / (1 + K_p \times q) \\
 q / q_{ad} &= (1 + K_p \times q) / (K_p \times q_{max}) \\
 q / q_{ad} &= (1 / K_p \times q_{max}) + (K_p \times q / K_p \times q_{max}) \\
 q / q_{ad} &= (1 / K_p \times q_{max}) + (q / q_{max}) \\
 q / q_{ad} &= (1 / K_p \times q_{max}) + (q / q_{max}) \\
 q / q_{ad} &= q / 1 \times 1 / q_{max} + 1 / K_p \times q_{max} \\
 y &= x \quad m \quad + \quad b \\
 K_p &= mb^{-1} \quad \quad \quad q_{max} = m^{-1}
 \end{aligned}$$

## III. Medios de Cultivo

Luria-Bertani.

	gL <sup>-1</sup>
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10

MRS con almidón

	gL <sup>-1</sup>
Peptona Pancreática de caseína	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio dibásico (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	2.17
Acetato de Sodio (CH <sub>3</sub> COONa · 3H <sub>2</sub> O)	5
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.207
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	0.056
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.62
Almidón soluble DIFCO	20

SOC

	gL <sup>-1</sup>
Triptona	20
Extracto de Levadura	5
NaCl	0.584
KCl	0.185
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.03
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.46
Glucosa	3.60

#### IV. Protocolos en la manipulación de DNA (Sambrook *et al.* 1989).

##### ❖ Lisis alcalina para células de *Escherichia coli*

1. Inocular al 1% 5 ml de medio LB-amp (100 µg ml<sup>-1</sup>) contenido un tubo de vidrio, crecer 12 h a 37°C a 150 rpm.
2. Centrifugar 1.5 ml de cultivo a 16,100 × g durante 3 min.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 100µL de la solución I, adicionar 200µl de solución II recién preparada y mezclar por inversión. Agregar 150µl solución III y mezclar perfectamente. Reposar 5 min a 4°C. Centrifugar 5 min a 16,100×g.
4. Recuperar el sobrenadante y adicionar un volumen isopropanol y un décimo de volumen de NaCl 5 M, precipitar 30 min a temperatura ambiente. Centrifugar 15 minutos a 16,100g.
5. Eliminar el sobrenadante y agregar 1 volumen de etanol 70%. Centrifugar a 16,100 × g por 5 min.
6. Eliminar el etanol 70% y secar el precipitado a temperatura ambiente ó unos minutos a 50°C.
7. Resuspender el DNA en agua destilada esterilizada pH 7. Agregar RNAsa (concentración final 20 µg ml<sup>-1</sup>) e incubar a 55°C por 1 h.

Solución I	Solución II	Solución III
50mM Glucosa	0.2 NaOH	5M CH <sub>3</sub> COOK 60 ml
25mM Tris-HCl	1% SDS	CH <sub>3</sub> COOH 11.5 ml
pH 8		H <sub>2</sub> O 28.5 ml
10mM EDTA pH 8		

##### ❖ Limpieza DNA fenol-cloroformo

1. Adicionar 450 µl de fenol-cloroformo (1:1) a la muestra de DNA tratada con RNAsa, agitar hasta formar una suspensión.
2. Centrifugar 5 min a 16,100×g, recuperar la fase acuosa.
3. Agregar 450µl de cloroformo-isoamílico (24:1), agitar y centrifugar 3 min a 16,100×g.
4. Recuperar la fase acuosa, añadir un décimo de volumen de NaCl 5M y 1 volumen de isopropanol, mezclar para homogeneizar y precipitar 30 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 15 min a 16,100×g y se retirar el sobrenadante.
6. Lavar con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar 5 min a 16,100×g.
1. Secar el botón a temperatura ambiente ó a 50°C, resuspender en 25 µl de agua estéril pH 7.
2. Analizar el plásmido obtenido en electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

❖ Células electrocompetentes

1. Inocular 500 ml de medio LB (en matraz Erlenmeyer de 2 L) con células *E. coli* al 1% de un cultivo fresco. Incubar a 37°C en agitación constante (150 rpm) hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.5-1.0.
1. Obtener las células por centrifugación. 11,000×g a 4°C durante 15 min.
2. Remover el sobrenadante y resuspender el botón celular en 500 ml de agua Milli-Q estéril fría. Centrifugar como en paso 2.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 250 ml de agua Milli-Q estéril fría. Centrifugar como en el paso 2.
4. Resuspender el botón celular en 10 ml de glicerol al 10% frío. Centrifugar como en el paso 2.
5. Finalmente resuspender las células en 1 ml de glicerol frío al 10% frío. La suspensión debe ser alicuotada (50µl) en hielo seco y guardada a -70°C. Las células son viables al menos 6 meses en estas condiciones.

❖ Electro-trasformación

1. Agregar a 50µl de células electrocompetentes 1 ó 2 µg de plásmido y se incuba en hielo por 2 min.
2. La mezcla de DNA y células se colocan en una cubeta de electroporación fría de 0.1cm. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5ms y 12.5 kV cm<sup>-1</sup>. Inmediatamente se adiciona 950 µl de medio SOC para resuspender las células.
1. Incubar a 37°C en agitación constante durante 1h.
2. Plaquesear la muestra en medio LB+ antibiótico, marcador de resistencia. Selección positiva.

**V. Protocolos para proteínas.**

❖ SDS-PAGE

1. Pre-migrar el geles durante 15 min a 20 mA.

Preparación de las muestras:

1. Las células de 1ml de cultivo fresco se resuspende en 35 µl de tampón Laemmli 4X. Calentar 5 min a 95°C. Enfriar y centrifugar, cargar 10 µl por carril del gel. Tampón de migración 1X.

Geles de Bis-acrilamida 30%:

Reactivo	Gel concentrador 4%	Gel separador 10%
Acilamida/Bis 30%	266 µl	3.32 ml
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	1.0 ml	—
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	—	2.5 ml
SDS 10%	40 µl	100 µl
Agua destilada	2.42 ml	4 ml
Temed	4.4 µl	5.5 µl
Persulfato de amonio 10%	22 µl	55 µl

Tampón de muestra 4x:

H <sub>2</sub> O destilada	8.5 ml
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 ml
Glicerol	2 ml
SDS 10%	4 ml
2-β mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	500 μl

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Composición	g l <sup>-1</sup>
Tris-base 125 M	15
Glicina	72
SDS	5

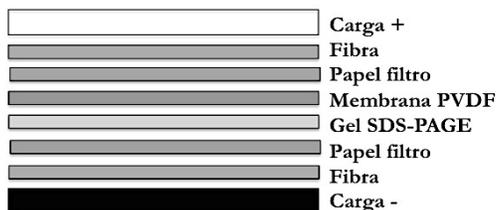
Revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie:

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

### ❖ Western Blot

Transferencia

1. Tampón de transferencia: 100 ml del tampón 10x + 100 ml de metanol. Aforar a 1 L.
2. Activar la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con tampón de transferencia.
3. Ensamblar el sándwich de la siguiente forma:



4. Realizar la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. En un ambiente frío, 4°C.
1. Una vez transcurrido el tiempo, secar la membrana sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3h, 1 h a 37°C ó se puede guardar durante algunos días.

## Reconocimiento con Anti-His

1. Preparar el tampón: PBS 1x, Tween 20- 0.05% y leche descremada al 3%.
1. Diluir el anticuerpo primario anti-His Roche cat. No. 1922416 (concentración final, 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en el tampón anterior. Incubar a 15-20°C 1-1.5 h en agitación ligera.
2. Realizar tres lavados de la membrana por 5 min con 10 ml de tampón PBS 1x/Tween 0.05%.
3. Preparar el anticuerpo secundario (anti-IgG) de la misma forma que el primario (concentración final 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), incubar y lavar de manera previamente descrita.

Revelado: El revelado se realiza utilizando la actividad de fosfatasa alcalina, que se encuentra acoplada al anticuerpo secundario.

1. Agregar 10 ml de BCIP/NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina, (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21g L<sup>-1</sup> y nitroazul de tetrazolio a una concentración de 0.42 g L<sup>-1</sup> en una base orgánica/ Tris tampón) al 80%, y se deja actuar hasta que sean visibles las bandas.
2. Detener la reacción con agua destilada.

---

Tampón de Transferencia 10x: 144g l<sup>-1</sup> de Glicina y 30g L<sup>-1</sup> de Tris base  
Tampón de inmunolocalización PBS 10x (Tampón de fosfatos:0.01M+ NaCl  
0.15M).

Anti-His Roche cat. No. 1922416.

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

---