



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO
DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MACARIA LARISSA LINARES CASTRO



MÉXICO, D.F.,



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

m. 347408



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

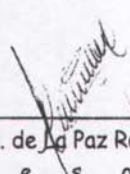
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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


Jurado asignado:

Presidente	Maria del Carmen Wachter Rodarte
Vocal	Ruth Edith Martín Fuentes
Secretario	Romina Ma. de La Paz Rodríguez Sanoja
1er Suplente	Francisco Ruiz Terán
2º Suplente	Emma González Chimeo

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



Dra. Romina Ma. de La Paz Rodríguez Sanoja
A s e s o r



Macaria Larissa Linares Castro
S u s t e n t a n t e

AGRADECIMIENTOS

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

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por los consejos, enseñanzas, el cariño y la gran comprensión que me ayudó a sobrepasar muchas cosas.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por la confianza que depositó en mí y por el apoyo siempre.

A la M. en C. Beatriz Ruiz Villafán por los muchos consejos y enseñanzas en este trabajo.

A el Biol. Rafael Cervantes Saavedra del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por los consejos que fueron parte fundamental de este trabajo y sobre todo por el buen humor.

A Monse y Daniel quienes siempre estuvieron en los mejores y peores momentos de este trabajo apoyándome y ayudándome.

A Silvia y Nadine les agradezco su amistad tan valiosa para mí.

A Gaby, Lalo, Lauris, Alonso, Adán y el resto de mis compañeros de laboratorio. Gracias por la calidez y compañerismo.

A mis padres por sus constantes cuidados y por darme la oportunidad de alcanzar muchos sueños.

A mi prima por ser más que una hermana. Gracias por tu apoyo tan incondicional siempre en todos los aspectos de mi vida.

A Elvira y Daniel por ser una luz en mi camino.

A Ale y Cristina por el apoyo y los buenos momentos.

A Salvador por el gran cariño.

A mis dos pequeñas niñas. Gracias por su cariño y sus risas.

A Adriana por los muchos grandes momentos que hemos compartido.

A Hilda por los años de amistad y por acompañarme a vivir esta vida.

A Itzajade y Paola por el compañerismo, el equipo y los excelentes momentos.

A Karina por su apoyo, amistad y confianza.

A Victo Hugo por la paciencia y comprensión en tu amistad.

A mis amigos de la Facultad: Sheila, Mariana, Daniela, Ernesto, Moisés, Javier, Ligia, Jorge, Liliana y Juan Carlos, Rafa, Norma, Israel, quienes hicieron aún mejor mi estancia en Química.

A Iván por la compañía tantas veces, por creer en mi, por el apoyo y la confianza que siempre me da fuerza y esperanza y sobre todo por el regalo del amor.

A la vida por permitirme disfrutar de esto.

ÍNDICE

Pag.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
1. ALMIDÓN	4
1.1. Estructura	4
1.2. Industria de la transformación del almidón	5
2. α -AMILASAS	7
2.1. Características y modo de acción	7
2.2. Estructura	9
3. DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN	10
3.1. Generalidades	10
3.2. Caracterización del fenómeno de adsorción	13
4. BACTERIAS LÁCTICAS	15
4.1. Bacterias Lácticas Amilolíticas (BLA)	15
4.2. Amilasas de Bacterias Lácticas	15
OBJETIVO	20
HIPÓTESIS	20
METODOLOGÍA	21
EXPLICACIÓN DETALLADA DE LA METODOLOGÍA	22
1) Obtención y digestión de los plásmidos pGEM-B5 y pBAD-HisC	24
2) Purificación de la UR, construcción genética en el vector pBAD-HisC y transformación en <i>E. coli</i>	25
3) Verificación de la construcción genética y secuenciación	25
4) Inducción del péptido que corresponde a 1UR	25
5) Identificación del péptido clonado en Western Blot	26
6) Producción y purificación del péptido	26
7) Eliminación del tallo de histidinas (6x-His).....	26
8) Purificación de la α -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>	27
9) Determinación de la capacidad del péptido de adsorberse al almidón insoluble	27
RESULTADOS	28
1) Obtención y digestión de los plásmidos pGEM-B5 y pBAD-HisC	28
2) Verificación de la construcción genética	29
3) Secuenciación	30
4) Inducción del péptido que corresponde a una UR	31
5) Identificación del péptido clonado en Western Blot	32
6) Purificación del péptido	33
7) Eliminación del tallo de histidinas (6x-His)	34
8) Purificación de la α -amilasa	35
9) Determinación de la capacidad del péptido de adsorberse al almidón insoluble	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

APÉNDICE A. MEDIOS DE CULTIVO	
A.1. Medio Luria-Bertani (LB) para crecer a <i>E. coli</i>	50
A.2. Medio SOC para electroporación	50
A.3. Medio MRS con almidón para crecer Bacterias Lácticas Amilolíticas	50
APÉNDICE B. MÉTODOS	
B.1. Extracción de plásmido por lisis alcalina - mini-preparación de plásmido-	51
B.2. Extracción de plásmido por lisis alcalina - midi-preparación de plásmido-	52
B.3. Elaboración de columnas de fibra de vidrio para purificar ADN	53
B.4. Electro-transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	54
B.5. Electroforesis horizontal en geles de agarosa (0.8%)	55
B.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	56
B.7. Western-Blot	58
B.8. Rompimiento de células por sonicación	61
B.9. Purificación de proteínas recombinantes en columnas de níquel	61
B.10. Diálisis	63
B.11. Preparación de la columna de β -ciclodextrina	63
APÉNDICE C. EL OPERÓN DE ARABINOSA	65

RESUMEN

Recientemente se secuenciaron los genes que codifican las α -amilasas de tres bacterias lácticas: *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorans*, encontrándose una estructura diferente a la reportada para el resto de las α -amilasas tanto procariotas como eucariotas. Dicha estructura está formada por dos dominios funcionales: el primero corresponde al dominio catalítico, el cual es muy similar al descrito para otras α -amilasas y el segundo corresponde al Dominio de Fijación al Almidón (DFA), siendo este último el que le confiere la particularidad a estas enzimas, ya que a diferencia del resto de las amilasas, está constituida por unidades repetidas (UR), directas e idénticas, de 91 aminoácidos cada una. El número de UR varía según la especie, *L. amylovorus* contiene cinco mientras que *L. plantarum* y *L. manihotivorans* contienen sólo cuatro.

Este trabajo se inició con la caracterización de este nuevo tipo de DFA, determinando si una unidad repetida es capaz de adsorberse al almidón insoluble por sí sola o bien si son necesarias todas las unidades para conferirle a la enzima la capacidad de adsorción al sustrato. Para responder a ésta pregunta se clonó una de las cinco UR de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* en el vector de expresión pBAD-HisC de *Escherichia coli*. Se llevaron a cabo ensayos de adsorción tanto para 1UR como para la amilasa entera para determinar la cantidad de proteína que se podía adsorber al gránulo de almidón. Se realizaron las isotermas de adsorción correspondientes y a partir de éstas se calcularon las constantes de adsorción (Kad).

Los resultados indican que 1UR es capaz de adsorberse al almidón insoluble ($Kad_{1UR} = 0.1872$) aunque en menor medida que la amilasa entera de *Lactobacillus amylovorus* ($Kad_{amilasa} = 0.5396$), ya que ésta se adsorbe alrededor de tres veces más. Con lo anterior se puede sugerir que el efecto de las unidades repetidas es sumatorio o sinérgico y que cada una de éstas actúa como un dominio de fijación al almidón independiente.

INTRODUCCIÓN

La industria de la transformación del almidón es una de las más importantes del mundo, solamente precedida por la de bebidas alcohólicas. A partir de ella se obtienen productos de alto valor agregado (Kennedy *et al.*, 1988) con gran aplicación en distintas industrias como la alimentaria, la energética, la textil, etc. Para transformar al almidón, éste debe ser sometido a altas temperaturas para gelatinizarlo, entonces es hidrolizado por la α -amilasa para obtener cadenas de menor peso molecular y con la acción de la glucoamilasa se llega hasta glucosa. Los jarabes de glucosa pueden ser empleados directamente para la producción de edulcorantes, jarabes fructosados, dextrosa o jarabes de maíz, o bien los jarabes de glucosa pueden ser fermentados para producir etanol, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos o productos novedosos como el polímero de ácido poliláctico que presenta cualidades muy similares a las de los plásticos y tiene la ventaja de ser biodegradable.

Específicamente las α -amilasas son endo-enzimas que hidrolizan al azar los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón. Son enzimas formadas por múltiples dominios: el dominio A es el dominio catalítico con una estructura tridimensional de barril (β/α)₈, el dominio B corresponde a una asa larga que se inserta entre la tercera lámina β y la tercera hélice α del barril, presenta una estructura irregular que depende del origen de la enzima y es entre este dominio y el A donde se localiza la bolsa del sitio activo. Casi todas estas enzimas presentan el dominio C, después del barril (β/α)₈ que se cree puede estabilizar al dominio catalítico (Mac Gregor *et al.*, 2001). También se ha sugerido que el dominio C está involucrado en la unión al sustrato (Dauter *et al.*, 1999 y Rashid *et al.*, 2002). En algunas de éstas se ha identificado un cuarto dominio, el dominio de fijación al almidón (DFA), que se encuentra en el extremo carboxilo terminal a excepción de la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* y *Arxula adenivorans* que lo presenta en el extremo amino terminal (Ashikari *et al.*, 1986, Cornett, *et al.*, 2003). El DFA está usualmente constituido por una centena de aminoácidos que forman varios segmentos de láminas β que se organizan en un barril- β distorsionado (Lawson *et al.*, 1994, Sorimachi *et al.*, 1997).

Los genes que codifican las α -amilasas en tres lactobacilos (*Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorus*) fueron secuenciados recientemente (Giraud *et al.*, 1997; Morlon-Guyot *et al.*, 2001). Los tres genes presentan entre ellos una identidad del 98%, sin embargo son muy diferentes al resto de las α -amilasas. En primer lugar, estas enzimas son particularmente grandes; alrededor de 100 kDa (Giraud *et al.*, 1997), lo cual corresponde a casi el doble de peso molecular del resto de las típicas α -amilasas microbianas (50-60 kDa) (Vihinen *et al.*, 1989). El peso molecular alto se debe a su estructura poco común, la cual puede dividirse en dos partes: la primera mitad; a partir del extremo amino-terminal, corresponde al dominio catalítico mientras que la segunda parte (extremo carboxilo-terminal) está constituida por unidades repetidas (UR) en tandem, directas e idénticas, cuya cantidad varía dependiendo de la especie: cinco para *L. amylovorus* y cuatro para *L. manihotivorus* y *L. plantarum*. Para la primera especie las UR se presentan continuas, mientras que en *L. manihotivorus* y en *L. plantarum* se encuentran flanqueadas por secuencias ricas en serinas y treoninas.

Por analogía con otras enzimas como las glucosiltransferasas, las dextran-sacarasas, las celulasas y las quitinasas (Giffard and Jacques, 1994; Gilmore *et al.*, 1990; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992) se infería que la función de las UR estaba relacionada con la adsorción de la enzima al sustrato, de tal forma que se clonaron tanto la amilasa entera de *L. amylovorus* como la misma amilasa sin UR (amilasa trunca), se compararon sus características bioquímicas, encontrándose que, mientras la enzima entera era capaz

de adsorberse al gránulo de almidón y de hidrolizarlo, la enzima trunca no lo era. Así, se determinó que la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* contenía un Dominio de Fijación al Almidón (DFA) constituido por una serie de cinco unidades repetidas (Rodríguez-Sanoja, 2000). Este dominio de aproximadamente 50 kDa es mucho más grande que el descrito para el resto de las amilasas, cuyo peso molecular se encuentra alrededor de 10 kDa. Al observar esta coincidencia se realizó la alineación de una de las UR con otros DFA de amilasas filogenéticamente cercanas encontrándose la presencia de aminoácidos conservados, principalmente los triptofanos, que han sido implicados en la unión al sustrato en diversas glucosil hidrolasas (glucoamilasas, ciclodextrina glucosiltransferasas o celulasas) (Coutinho y Relly, 1994, Goto *et al.*, 1994, *et al.*, 1991, Svensson, 1991, Svensson *et al.*, 1989, Warren, 1996).

Considerando que cada unidad repetida presenta el mismo tamaño que el resto de los DFA reportados para amilasas y que en cada una de éstas se encuentran aminoácidos conservados e importantes para la fijación al sustrato, se podría pensar que 1UR por si sola sería capaz de fijarse al almidón insoluble. Siendo así el objetivo de este trabajo, clonar una unidad repetida de las cinco presentes en la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* para determinar si la proteína resultante es capaz de adsorberse al almidón insoluble.

Con este estudio se pretende contribuir a la caracterización molecular de este DFA del cual se conoce muy poco. Por otro lado, la trascendencia de este trabajo no sólo se centra a nivel científico, sino también se busca la aplicación en la industria biotecnológica, ya que al presentar la UR la capacidad de adsorberse al almidón insoluble se podría utilizar como tallo de purificación para proteínas recombinantes, o bien, en la industria de los alimentos para inmovilizar enzimas y en bioremediación. La ventaja de aplicar este péptido en los ámbitos antes mencionados, recae en la utilización de una matriz de bajo costo como es el almidón.

ANTECEDENTES

1. ALMIDÓN

El almidón es una importante fuente de carbono que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Vihinen, M., Mäntsäälä, 1989). En los vegetales, como los tubérculos es parte estructural, en los cereales es la primordial forma de reserva energética y para el humano representa la principal fuente de carbohidratos (Othón, 1996).

Para la humanidad los cereales constituyen un conjunto de plantas de gran importancia, ya que son el alimento que proporciona energía y numerosos nutrimentos al organismo. Las reservas de carbohidratos en el grano son derivados de la fotosíntesis de la planta. Durante la fotosíntesis se utiliza CO_2 del aire, agua y radiación solar para formar azúcares. La síntesis del almidón comienza por la formación de ADP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y de ATP, reacción catalizada por la ADP-glucosa fosforilasa (EC 2.7.7.23). La cadena se alarga añadiendo ADP-glucosa al extremo no reductor de la cadena de α -1,4 glucano. La reacción se realiza por la almidón sintasa (EC 2.4.1.21) y la cadena lineal de α -1,4 glucosas es utilizada como sustrato por la enzima ramificante del almidón (EC 2.4.1.28) que introduce las ligaciones α -1,6 entre las cadenas para formar amilopectina (Slattery, *et al.*, 2000).

1.1. Estructura.

Químicamente, el almidón consiste en dos polímeros de diferentes estructuras: la amilosa y la amilopectina. La amilosa está formada por cadenas de glucosas, las cuales se unen entre sí por enlaces glucosídicos α -1,4 (fig 1a). En el espacio, la amilosa adquiere una conformación tridimensional helicoidal (fig 1b) de cadena sencilla o doble, el interior de la hélice es de carácter hidrofóbico mientras que el exterior es hidrofílico (Barsby *et al.*, 2001).

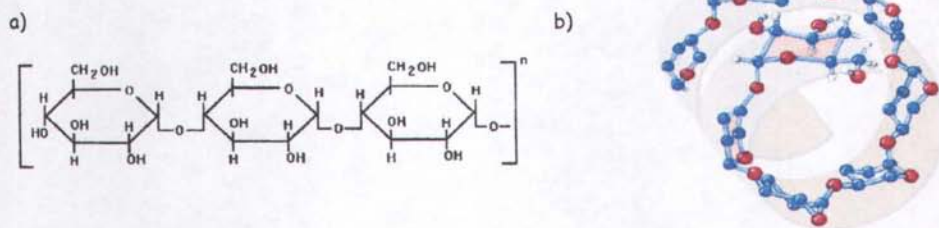


Fig. 1: Molécula de amilosa.

a) Representación química de la amilosa, donde se observan los enlaces glucosídicos α -1,4, b) Conformación tridimensional helicoidal de la amilosa.

La segunda molécula que conforma el almidón es la amilopectina, la cual es una cadena ramificada formada a su vez por cadenas de amilosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,6 y se puede representar de la siguiente manera (Barsby et al., 2001):

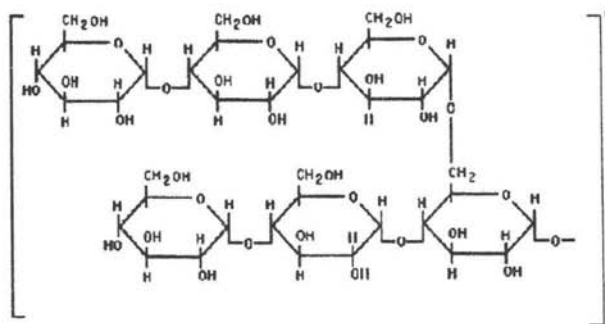


Fig. 2: Molécula de amilopectina.

1.2. Industria de la transformación del almidón.

El almidón es ampliamente utilizado en la producción de alimentos y bebidas, en la fabricación de papel y adhesivos, así como en la industria textil y energética. Tiene un gran potencial como material insoluble en la industria química y como fuente de energía, ya que la glucosa, el producto más importante de la hidrólisis del almidón, puede ser convertida a otros productos como etanol, ácidos orgánicos o antibióticos por fermentación y a fructosa por isomerización enzimática (Kennedy *et al.*, 1988).

Las aplicaciones más importantes del almidón y sus productos en la industria de los alimentos son las siguientes:

1. Hidrólisis parcial del almidón para generar dextrinas que son utilizadas como espesantes.
2. Obtención de jarabes de alta maltosa utilizados en la fabricación de cerveza y confituras (dulces, helados).
3. Obtención de jarabes de alta glucosa utilizados en la fabricación de cerveza, panes y repostería, confituras y bebidas no alcohólicas.
4. Hidrólisis parcial del almidón en la industria panadera para la liberación de glucosa que es utilizada como sustrato de fermentación por las levaduras para el leudamiento de la masa. (Fennema, *et al.*, 1996).

En la industria, la transformación del almidón puede ser química o enzimática. La transformación química comienza con una hidrólisis ácida (comercialmente se usa ácido clorhídrico), este proceso es más o menos azaroso e inicia liberando fragmentos muy largos. Después, se calienta la mezcla hasta obtener el grado de despolimerización deseado, se neutraliza el ácido y se recupera el producto, se lava y se seca. El producto aún es granular, ya que sólo algunos enlaces glucosídicos han sido

hidrolizados, sin embargo, los gránulos de almidón se desintegran mucho más fácilmente durante el calentamiento con agua y por lo tanto se hidrolizan con mayor facilidad. Los almidones hidrolizados forman geles claros y fuertes, además, presentan una viscosidad baja; son usados en productos como panes y dulces o en cualquier alimento donde se desea un gel fuerte.

Una modificación más extensa con ácido produce dextrinas. Las dextrinas pueden ser usadas en altas concentraciones en los procesos de los alimentos, son blandas, prácticamente carecen de dulzor y son excelentes para contribuir al cuerpo de los alimentos, tienen propiedades adhesivas y son usados como rellenos, agentes encapsulantes y son acarreadores de sabores. La hidrólisis da mezcla de moléculas que una vez secas son llamadas sólidos de jarabes de maíz, los cuales se disuelven rápidamente y son medianamente dulces.

Si se continúa la hidrólisis del almidón se produce una mezcla de D-glucosa, maltosa y otros malto-oligosacáridos. Los jarabes con esta composición se producen en enormes cantidades y son estables porque no se cristalizan fácilmente. Se venden en concentraciones de alta osmolaridad, lo suficiente como para evitar que los microorganismos ordinarios puedan crecer en ellos.

El jarabe de maíz es la mayor fuente de D-glucosa y D-fructosa. Para la elaboración enzimática de un jarabe de maíz se mezcla el almidón con agua con una α -amilasa termoestable y se calienta llevándose a cabo una gelatinización rápida y la hidrólisis catalizada por la enzima (licuefacción). Después de enfriar hasta 55-60°C, se continúa la hidrólisis con la glucoamilasa, donde se clarifica el jarabe, se concentra, se refina con carbón y se lleva a cabo un intercambio iónico.

Para la producción de D-fructosa, una solución de D-glucosa se pasa a través de una columna con glucosa isomerasa inmovilizada. La enzima cataliza la isomerización de la D-glucosa a D-fructosa hasta un equilibrio de un 58% de D-glucosa y 42% de D-fructosa. Generalmente se desean concentraciones más altas de D-fructosa; de aproximadamente 55%, estos jarabes de maíz son llamados de alta fructosa y se usan como endulzantes suaves en bebidas (Fennema, *et al.*, 1996).

En resumen, industrialmente se usan de tres a cuatro enzimas para llevar a cabo la hidrólisis del almidón hasta D-glucosa. La α -amilasa es una endo-enzima que corta tanto las moléculas de amilosa como las de amilopectina internamente, produciendo oligosacáridos. Los oligosacáridos pueden encontrarse ramificados por enlaces 1-6, ya que la α -amilasa sólo actúa en los enlaces 1-4 del almidón. La α -amilasa no ataca segmentos del polímero en doble hélice ni segmentos que forman complejos con lípidos.

La glucoamilasa es usada comercialmente en combinación con la α -amilasa para producir jarabes de D-glucosa (dextrosa) y D-glucosa cristalina. La enzima actúa sobre el almidón completamente gelatinizado como una exo-enzima, liberando secuencialmente unidades de D-glucosa desde los extremos no reductores de las moléculas de amilosa y amilopectina, incluso actúa en aquellas moléculas unidas por enlaces 1-6. Consecuentemente, la enzima puede hidrolizar por completo al polímero hasta D-glucosa, pero es usada en almidón que ha sido despolimerizado previamente con α -amilasa porque en éste se han generado mayor cantidad de fragmentos pequeños y más extremos no reductores.

La β -amilasa libera secuencialmente el disacárido maltosa desde el extremo no reductor de la amilosa. También ataca el extremo no reductor de la amilopectina, liberando maltosa, pero no puede romper los enlaces 1-6 en los puntos de ramificación dejando fragmentos de amilopectina llamados dextrina límite.

Existen muchas enzimas desramificadoras que hidrolizan específicamente las uniones 1-6 de la amilopectina en los puntos ramificados, produciendo muchas moléculas lineales pero de bajo peso molecular. Una enzima de este tipo es la isoamilasa o la pululanasa.

La ciclodextrina glucosiltransferasa es la única enzima de *Bacillus* que forma anillos de 1 a 4 unidades de α -D-glucopiranosas a partir de polímeros de almidón. La enzima puede formar anillos de seis, siete y ocho miembros, los cuales son respectivamente alfa-, beta- y gamma- ciclodextrinas. Estos productos tienen la habilidad de acomplejarse con sustancias hidrofóbicas que son atrapadas en el centro del anillo. Debido a esta capacidad de acomplejamiento con este tipo de moléculas, se pueden convertir aceites esenciales en polvos en los cuales el sabor o la sustancia aromática es protegida de la luz y el oxígeno pero se liberan fácilmente cuando el complejo es añadido a un sistema acuoso debido a la solubilidad en agua de las ciclodextrinas. Las ciclodextrinas no han sido aprobadas aún para su uso en alimentos en los Estados Unidos. Sin embargo, las esferas poliméricas insolubles de ciclodextrinas han mostrado ser útiles para remover componentes amargos en jugos cítricos.

2. α -AMILASAS

2.1. Características y modo de acción.

Las α -amilasas se encuentran presentes en una gran variedad de organismos; en plantas, animales, hongos y microorganismos. Son utilizadas ampliamente en la industria, donde se obtienen principalmente de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* por su gran termoestabilidad o también de hongos, particularmente del género *Aspergillus* (Pandey *et al.*, 2000). El pH óptimo de estas enzimas es alrededor de 5, sin embargo algunas son estables en un rango mucho más amplio 4-11 (Fogarty *et al.*, 1979, Vihinen *et al.*, 1989, Hamilton *et al.* 1999, Saito, 1973, Khoo *et al.*, 1994). Su temperatura óptima está relacionada con la del crecimiento del microorganismo (Vihinen *et al.*, 1989).

Las α -amilasas son endo-enzimas que hidrolizan al azar los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón dando como productos maltosa, maltotriosa y dextrina límite, aunque con tiempos prolongados de hidrólisis llegan a hidrolizar al almidón hasta glucosa. En la clasificación basada en la estructura primaria de las glucosilhidrolasas, estas enzimas pertenecen a la familia 13 (GH13) (Henrissat *et al.*, 1996), que incluye hidrolasas y transglucosidasas, exo-enzimas y endo-enzimas específicas para enlaces α -1,4 (Svensson *et al.*, 2002). Esta familia, contiene alrededor de 28 especificidades diferentes, abarca más de 700 miembros (Svensson *et al.*, 2002) y presenta tres características principales: (i) el dominio catalítico presenta una estructura tridimensional de barril (β/α)₈; estructura conocida también como barril TIM (triosa fosfato isomerasa), (ii) presenta 3 residuos de aminoácidos conservados identificados como los responsables de llevar a cabo la hidrólisis: dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico y (iii) cuando se lleva a cabo la hidrólisis estas enzimas mantienen la configuración del carbono anomérico en el producto (Davies, G. and Henrissat, B., 1995).

La hidrólisis enzimática del enlace glucosídico se lleva a cabo vía catálisis ácida y requiere dos residuos: un donador (ácido) y un nucleófilo (base). Esta hidrólisis ocurre por dos tipos de mecanismos; en uno se mantiene la configuración del carbono anomérico y en el otro se invierte (fig. 3) (Davies, G. and Henrissat, B., 1995). En ambos la posición del protón es la misma. Sin embargo, en

enzimas que retienen la configuración, la base catalítica o nucleófilo se encuentra adyacente al carbono anomérico del azúcar, pero en enzimas que invierten la configuración esta base está a una distancia mayor, de tal forma que interactúa una molécula de agua entre la base y el azúcar. Esta diferencia resulta en una distancia de 5.5 Å entre los dos residuos catalíticos en enzimas que retienen la configuración y en una distancia de 10 Å en enzimas que invierten la configuración (McCarter y Withers, 1994).

El papel de los tres residuos catalíticos ha sido descrito por varios autores. En la Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae* se estableció que los aminoácidos involucrados en la hidrólisis eran los residuos Glu230, Asp206 y Asp297 (Matsuura *et al.*, 1984). El residuo Glu230 corresponde al donador de protones (AH) descrito en la figura 3, mientras que uno de los dos ácidos aspárticos (Asp 206) actúa como el nucleófilo (B⁻). Se ha sugerido que el papel del residuo Asp297 es el de estabilizar el complejo enzima-azúcar manteniendo al ácido glutámico protonado y activo (Uitdehaag *et al.*, 1999).

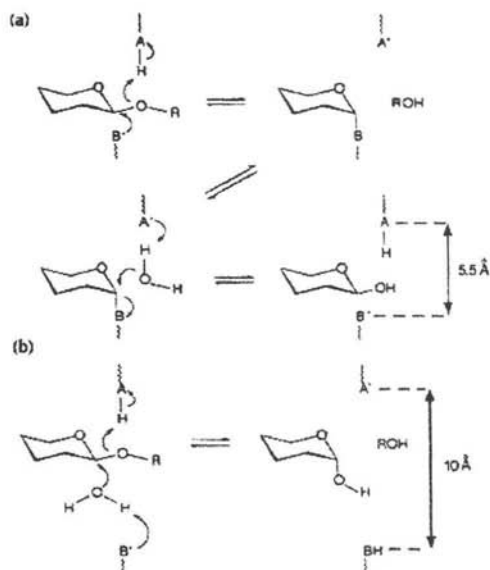


Figura 3: Mecanismos de acción de las glucosil-hidrolasas como se propuso por primera vez por Koshland en 1953.

a) Mecanismo de retención de la configuración. El oxígeno del enlace glucosídico es protonado por el ácido (AH) y la base estabiliza la salida del aglicón. Una molécula de agua ataca al complejo enzima-azúcar resultante, esta segunda sustitución nucleofílica en el carbono anomérico genera un producto con la misma estereoquímica que la del sustrato.

b) Mecanismo de inversión de la configuración. La protonación del oxígeno del enlace glucosídico y la salida del aglicón está acompañada por un ataque concomitante de una molécula de agua que es activada por el residuo básico (B⁻). Esta sustitución nucleofílica en un solo paso da un producto con estereoquímica opuesta a la del sustrato.

AH: ácido glutámico B⁻: ácido aspártico

2.2. Estructura.

Las α -amilasas están compuestas de una sola cadena polipeptídica que forma múltiples dominios. El dominio A o dominio catalítico se encuentra, en la mayoría de las amilasas, en el extremo amino-terminal y presenta una estructura de barril (β/α)₈; está constituido por ocho láminas- β rodeadas por ocho hélices- α (fig. 4A). Las asas del barril pueden ser lo suficientemente largas como para ser consideradas como dominios (Mac Gregor *et al.*, 2001). Así, se determinó que el asa que se inserta entre la tercera lámina- β y la tercera hélice- α corresponde al dominio B. La bolsa del sitio activo se encuentra entre estos dos dominios; en dirección al extremo C-terminal, entre la cuarta y quinta lámina- β de la estructura de barril con los residuos catalíticos localizados en las asas de estas láminas (Matsuura, 2002).

La gran mayoría de los miembros de esta familia tienen un tercer dominio, dominio C, localizado después de la estructura de barril, constituido por láminas- β y se cree que pueden estabilizar al dominio catalítico protegiendo a los residuos hidrofóbicos del dominio A del solvente. También se ha sugerido que este dominio está involucrado con la unión al sustrato (Dauter *et al.*, 1999 y Lawson *et al.*, 1994) (fig. 4B).

Muchos de los miembros de la familia GH13 contienen un dominio extra en el extremo N-terminal antes del barril TIM que se ha denominado N (Jespersen *et al.*, 1991). La función de este dominio aún es incierta. En la isoamilasas o malto-oligosiltrealosa trealohidrolasa, el dominio N se localiza cerca del asa que une a la tercera lámina β con la tercera hélice α del barril y algunos autores sugieren que los residuos de este dominio pueden formar parte del sitio activo de la enzima (Katsuya *et al.*, 1998, Feese *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha observado en la α -amilasa II' de *Thermoactinomyces vulgaris* que el dominio N se encuentra demasiado lejos del sitio activo como para participar en la actividad de la enzima (Katsuya *et al.*, 1998, Kamitori *et al.*, 1999).

En la ciclodextrina glucosiltransferasas (CGT) y en 'amilasas' maltogénicas se han encontrado dos dominios adicionales después del dominio C, los dominios D y E, constituidos por láminas- β (Dauter *et al.*, 1999, Hofmann *et al.*, 1989 y Harata *et al.*, 1996). Si las enzimas poseen tanto al dominio D como el E, generalmente no contienen el dominio N y son enzimas con 5 dominios que poseen el barril (β/α)₈ (dominio A) y los cuatro dominios B, C, D y E. En el caso de enzimas como las α -amilasas, glucoamilasas y β -amilasas de cuatro dominios y que no contienen dominio N, sólo el dominio E y no el D se encuentra presente. La función del dominio D no se ha determinado, mientras que la del dominio E se ha descrito como la de fijación al almidón granular y también se ha propuesto que provee una extensión al sitio activo en CGTasas (Hofmann *et al.*, 1989 y Jespersen *et al.*, 1991). Este dominio se encuentra en enzimas que degradan almidón insoluble, como en glucoamilasas (familia 15), en muy pocas β -amilasas (familia 14) y α -amilasas (Jespersen *et al.*, 1991). Así, este dominio E también ha sido denominado dominio de fijación al almidón (DFA) en las enzimas que lo poseen.

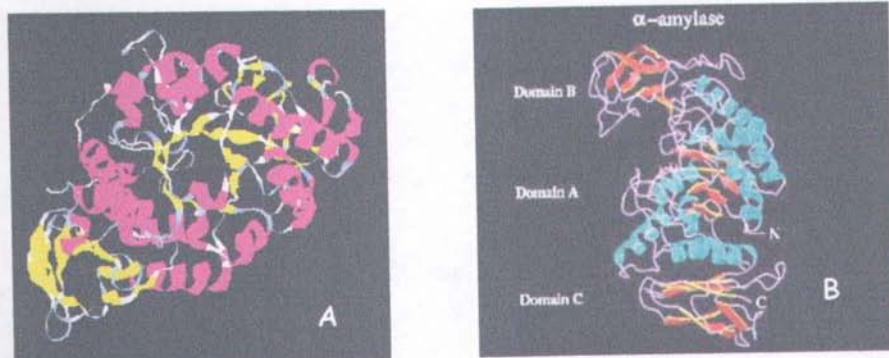


Fig. 4: Estructura tridimensional de la taka amilasa de *Aspergillus* sp. donde se observa la estructura de barril (A) (Sussman *et al.*, 1998; Abola *et al.*, 1997) y de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (B) (Hwang, *et al.*, 1997).

3. DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN

3.1. Generalidades

Las proteínas con capacidad de adsorción a carbohidratos han sido divididas en dos grandes grupos basándose en la topología del sitio de fijación y en su localización (Drickamer, 1989; Quijcho, 1986; Rini, 1995). El primer grupo presenta un sitio de fijación cubierto y está constituido por proteínas periplásmicas de unión a monosacáridos, transportadores de azúcar unidos a la membrana y enzimas como hexoquinazas y exoglucanasas, entre otras. En el segundo grupo, la topología del sitio de fijación es mucho más abierta en su superficie y contiene proteínas como lectinas, endoglucanasas, inmunoglobulinas, toxinas y enzimas con módulos de fijación a carbohidratos (CBM; por sus siglas en inglés: Carbohydrate-Binding Modules). Numerosas proteínas y dominios en esta segunda categoría se unen a carbohidratos insolubles como la celulosa.

En proteínas activas sobre carbohidratos, los módulos de fijación al sustrato se encuentran unidos a los dominios catalíticos y el sitio de unión de los dominios de fijación es una hendidura superficial o una superficie plana (Lehtiö, 2001). Por definición, un módulo de fijación a carbohidratos es una secuencia continua de aminoácidos en una enzima activa sobre carbohidratos que presenta un enrollamiento discreto y con una actividad de fijación a carbohidratos independiente. Estos módulos también han sido llamados dominios y debido a que una gran cantidad de nuevos módulos han sido descubiertos en los últimos años, Coutinho y Henrissat (1999) han realizado una nueva clasificación donde se incluyen todos los módulos de fijación a carbohidratos conocidos.

Dentro de los CBM's se encuentran los dominios de fijación al almidón (DFA). La mayor parte de los estudios disponibles sobre DFAs se centran en la familia 20. Estos DFA están presente en aproximadamente 10% de las enzimas amilolíticas de las familias de las glucosil hidrolasas 13, 14 y 15 (Svensson *et al.*, 1989 y Janeček *et al.*, 1999). La presencia del DFA en una enzima amilolítica está muy relacionada con el origen de la enzima. Los miembros de la familia de la α -amilasa que contienen

DFA se han detectado principalmente en microorganismos; en particular en hongos filamentosos, bacterias Gram positivas, Proteobacterias de la subdivisión- γ , actinomicetos y Archaea (Janeček *et al.*, 2003).

Los DFA están generalmente constituidos por una centena de aminoácidos ordenados en láminas- β antiparalelas que se arreglan en forma de barril. Las α -amilasas que no contienen DFA y aquellas que sí lo poseen, presentan velocidades similares de degradación del almidón soluble, sin embargo, no existe la misma capacidad para hidrolizar el almidón insoluble, ya que el DFA facilita su hidrólisis de dos formas; incrementando la concentración local del sustrato en el sitio activo del dominio catalítico y desestabilizando la superficie del gránulo de almidón (Hayashida *et al.*, 1989; Southall *et al.*, 1999).

La importancia funcional de los dominios de fijación a carbohidratos en hidrolasas ha sido claramente demostrada, aunque su modo de acción no está completamente definido. El fenómeno de adsorción ha sido básicamente estudiado en glucoamilasas (Sorimachi *et al.*, 1997) y en CGTasas (Lawson *et al.*, 1994) y los resultados se han extrapolado para algunas α y β -amilasas por la similitud que presentan sus secuencias.

Tabla 1: Clasificación de los Módulos de fijación a carbohidratos

Familia	Cantidad de miembros	Tamaño aproximado (aa)	Estructura 3D	Substratos de unión
1	71	30-40	Si	Celulosa, quitina
2a	88	110	Si	Celulosa, quitina
2b		90	Si	Xilano
3	55	150	Si	Celulosa, quitina
4	17	150	Si	Xilano, celulosa amorfa
5	3	60	Si	Celulosa
6	20	120	Si	Celulosa amorfa, xilano
7	-	-	-	-
8	1	150	No	Celulosa
9	16	170	Si	Celulosa, mono-, di- y oligosacáridos
10	10	50	Si	Celulosa
11	3	180-200	No	Celulosa
12	63	40-60	No	Quitina, celulosa
13	94	150	Si	Xilano, manosa, GalNac
14	91	70	No	Quitina, celulosa
15	2	40	No	Celulosa
16	7	160	No	Xilano, celulosa amorfa
17	8	200	No	Celulosa amorfa, celoogligosacáridos
18	144	40	No	Quitina, celulosa
19	4	60-70	No	Quitina
20	60	100	Si	Almidón granular Ciclodextrinas
21	21	100	No	Almidón
22	38	160	Si	Xilano
23	1	200	No	Manano soluble
24	3	80	No	α -1,3-glucano
25	9	110	Si	Almidón
26	9	100	No	Almidón, manano
27	5	100	No	Manano
28	8	200	No	Celulosa amorfa, celoogligosacáridos
Resumen	841	30-200	Referencias:	Coutinho y Henrissat, 1999

3.2. Caracterización del fenómeno de adsorción.

El fenómeno de adsorción del dominio de fijación al almidón fue estudiado inicialmente por mutagénesis dirigida en la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, encontrándose que los aminoácidos importantes para que se lleve a cabo este fenómeno son principalmente los triptofanos (Goto *et al.*, 1994).

Posteriormente Sorimachi *et al.*, en 1997 determinaron por resonancia magnética nuclear (RMN), que en el DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* existen dos sitios de unión al sustrato. En el sitio 1 se identifican dos triptofanos (Trp543 y Trp590) que son críticos para la unión y en el sitio 2 se identifican los residuos Ala523, Thr526, Tyr527, Ala 553, Tyr556 y Leu562. Algunos de estos residuos se localizan en las asas de la segunda, tercera y cuarta lámina- β . Utilizando β -ciclodextrina (β CD) como modelo del sustrato se observó que los residuos Trp543 y Trp590; del sitio 1, son el centro de muchas interacciones y que exponen una región hidrofóbica, compacta y rígida, que forma un espacio interno entre los anillos, también estabilizan a los aminoácidos del rededor para crear una superficie adecuada para la unión de los enlaces α -1,4 de la glucosa, además se identificaron próximos a los anillos del azúcar, donde fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno refuerzan esta interacción. La estructura de este sitio de unión es muy similar a la del complejo CGT-maltosa estudiado por Lawson *et al* en 1994. Sin embargo, se debe recordar que la estructura del almidón no se conoce con detalle; aunque ya se hayan propuesto diversos modelos, de tal forma que no es posible extrapolar un esquema preciso para el complejo DFA-almidón a partir del complejo β CD-almidón. De cualquier forma, se podría pensar que todos los residuos que se han identificado como ligandos importantes para la β CD pueden formar puentes de hidrógeno con el almidón y que algunas interacciones pueden estar mediadas por moléculas de agua. El sitio 2 de unión es más extenso y la interacción proteína-ligando está dada una vez más por efectos hidrofóbicos de dos anillos aromáticos: Tyr527 y Tyr556. Estos anillos parecen interaccionar con la β CD por fuerzas de van der Waals, sin embargo la posición del ligando en este sitio de unión es más variable, lo cual se puede atribuir a la flexibilidad del residuo Tyr527. Es posible que con ligandos o sustratos más grandes la flexibilidad de este residuo se vea reducida, ya que habría una superficie de interacción proteína-ligando más grande. También es posible que la flexibilidad asociada con Tyr527 posea la función de localizar al ligando y dirigirlo hacia el sitio de unión (Sorimachi *et al.*, 1997).

En la estructura de la CGT también se presentan residuos de tirosina en una posición muy similar a la del residuo Tyr556 de la glucoamilasa (Tyr633 en el complejo CGT-maltosa). En el complejo DFA- β CD, Tyr556 se mueve cerca de los residuos Asp554 y Lys555, mientras que en la CGT libre, el anillo aromático de la tirosina equivalente para esta enzima, se mueve cerca de los residuos Asn626 y Gln627. Estos residuos han sido identificados como sitios de unión al sustrato para ambas enzimas (Sorimachi *et al.*, 1997).

En el sitio 2 de unión de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, existen residuos en la superficie de la proteína que se encuentran a una distancia tal que pueden formar puentes de hidrógeno directos o mediados por una molécula de agua con el almidón. Asp554 y Lys555 tienen sus cadenas expuestas hacia el exterior de la proteína de tal forma que pueden tener una interacción con un ligando grande. Algunos residuos (Thr525 y Thr526 por ejemplo) que eran flexibles en la superficie de la estructura libre del DFA, se aproximan hacia el sitio de unión con la presencia del ligando, lo que contribuye a la estabilidad de la interfase de unión. Estos residuos del sitio 2 forman una superficie de unión mayor a la que presenta el sitio 1, lo cual puede deberse a las diferentes

funciones de los dos sitios. Un resumen de las posibles interacciones intermoleculares de ambos sitios se presenta en el siguiente esquema.

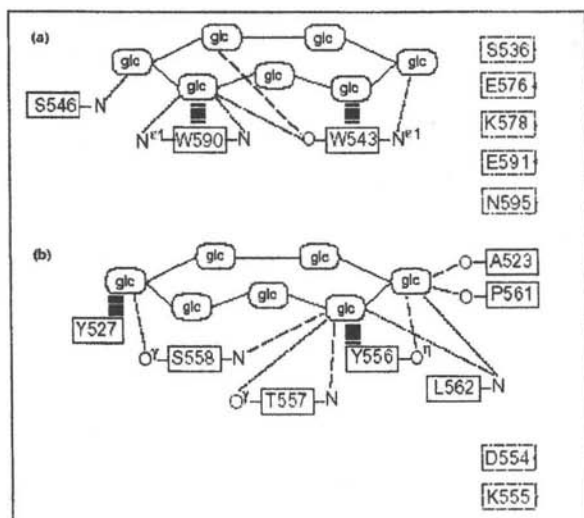


Fig. 5: Diagrama que representa las interacciones intermoleculares que se sugieren para los dos sitios de unión del DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. *Kawachi* con la βCD (Sorimachi *et al.*, 1997).

(a) sitio de unión 1 y (b) sitio de unión 2. La molécula de βCD son las siete unidades marcadas 'glc'. Las interacciones hidrofóbicas están representadas por líneas largas horizontales entre el azúcar y el anillo aromático. Las uniones directas con el hidrógeno se muestran como líneas incompletas y las líneas punteadas representan posibles puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua. Los residuos encerrados en rectángulos punteados son los que se encuentran en la superficie de la proteína y que pueden interactuar con ligandos más grandes.

Los dominios de fijación a carbohidratos físicamente separados del dominio catalítico y que se unen específicamente a sustratos insolubles no sólo se han encontrado en amilasas como: α y β-amilasas de bacterias (Itkor *et al.*, 1990, Bahl, *et al.*, 1991, Nanmori *et al.*, 1983 y Kitamoto *et al.*, 1988), glucoamilasas (Sorimachi *et al.*, 1997) y ciclodextrina glucosiltransferasas (Nitschke *et al.*, 1990 y Lawson *et al.*, 1994), sino también en otras enzimas que hidrolizan carbohidratos diferentes al almidón, como en quitinasas (Watanabe *et al.*, 1994), celulasas (Lyman *et al.*, 1995), xilasas (Millward-Sadler *et al.*, 1994) y celulasas (O'Neill *et al.*, 1986).

4. BACTERIAS LÁCTICAS.

Las bacterias lácticas son microorganismos gram positivos, generalmente inmóviles, anaerobios pero aerotolerantes. Tienen exigencias nutricionales complejas en lo que concierne a aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y azúcares fermentables. Todas las bacterias lácticas tienen un metabolismo fermentativo estrictamente sacarolítico y como producto de la utilización de azúcares se obtiene sólo ácido láctico (bacterias homolácticas estrictas), ácido láctico y acético (bacterias heterolácticas facultativas) o ácido láctico, ácido acético, etanol y CO_2 (bacterias heterolácticas estrictas). Las bacterias lácticas en forma de coco pertenecen a los géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* y *Atopobium*, mientras que las que poseen forma de bacilo son: *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Sin embargo, la denominación de bacteria láctica también se aplica para otras bacterias relacionadas como: *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* y *Propionibacterium* (Roissart y Luquet, 1994).

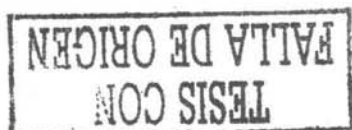
4.1. Bacterias lácticas amilolíticas (BLA).

La capacidad de las bacterias lácticas para fermentar almidón fue reportada por primera vez por Sherman en 1937 cuando encontró que algunos estreptococos aislados del tracto digestivo de ruminantes producían ácido en sustratos amiláceos (Sherman, 1937). A partir de esa fecha se han aislado bacterias lácticas amilolíticas (BLA) de diversos sustratos; como ensilados de maíz (Nakamura, 1981, Nakamura y Crowell, 1979), desperdicios vegetales (Sen y Chakrabarty, 1984), de malta y mostos cerveceros (Bohak *et al.*, 1998), de ensilados de pescado mezclado con cereales (Lindgren y Refai, 1984); así como del tracto digestivo y heces de bovinos, ovejas, puercos, caballos y pollos (Cotta, 1992, Champ *et al.*, 1983). La cantidad de BLA que se han identificado abarcan alrededor de una docena y comprende las siguientes especies: *Lactobacillus amylophilus* (Nakamura y Crowell, 1979), *Lactobacillus fermentum* (Sanni *et al.*, 2002), *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981), *Lactobacillus plantarum* (Brauman *et al.*, 1996), *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 1998), *Lactobacillus cellobiosus* (Sen and Chakrabarty, 1984), *Lactobacillus amyolyticus* (Bohak *et al.*, 1998), *Streptococcus bovis* (Hardie, 1986), *Streptococcus equinus* (Cotta, 1992), *Leuconostoc sp* (Lindgren y Refai, 1984), *Pediococcus sp.* (Díaz-Ruiz, 2003).

4.2. Amilasas de bacterias lácticas.

La capacidad amilolítica de las bacterias lácticas se debe aparentemente a la producción de α -amilasas ya que sólo existe un reporte de la presencia de una glucoamilasa en *Lactobacillus amylovorus* (James y Lee, 1995). La mayoría de las α -amilasas son extracelulares y existen especies que producen amilasas asociadas a la célula (Díaz-Ruiz, 2003). En las amilasas descritas hasta el momento, *Lactobacillus fermentum* (Agati *et al.*, 1998), *Lactobacillus cellobiosus* (Sen, *et al.*, 1984), *Lactobacillus manihotivorans* (Aguilar, *et al.*, 2000), *Lactobacillus plantarum* (Giraud, 1993), *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylophilus* (Castillo, *et al.*, 1993), *Streptococcus* (Satoh, *et al.*, 1993 y Simpson y Russell, 1998) y *Leuconostoc* (Lindgren y Refai, 1984) se ha observado una actividad óptima a un pH cercano a 5 y una gran tolerancia a pH ácidos (Rodríguez-Sanoja, 2001).

Al secuenciar los genes que codifican las α -amilasas de tres de estos lactobacilos: *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorans* se encontró que las proteínas resultantes presentan una identidad del 98% entre ellas y que tienen una estructura diferente a la reportada; constituida por el dominio catalítico en el extremo N-terminal y series de unidades



repetidas (UR), de 91 aminoácidos cada una, directas e idénticas en el extremo C-terminal. Debido a la presencia de las UR, las α -amilasas de estos lactobacilos son casi del doble de peso molecular (100 kDa aprox.) que el resto de las típicas α -amilasas microbianas (50-60 kDa aprox.). La cantidad de UR varía de una especie a otra; *Lactobacillus amylovorus* contiene cinco, se presentan de manera continua y en los extremos de éstas hay secuencias ricas en serinas y treoninas (fig. 6) cuya función en otras glucosil hidrolasas ha sido identificada como la de unir dominios (Tomme *et al.*, 1995). *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorus* contienen cuatro UR, pero no se encuentran continuas, ya que existen unidades intermedias ricas en serinas y treoninas entre cada una de éstas (fig. 6). Además, en la cuarta unidad intermedia de la α -amilasa de *L. manihotivorus*, hay una delección de 30 pares de bases, siendo la diferencia más notable entre estas dos enzimas (Giraud and Cuny, 1997, Morlon-Guyot *et al.*, 2001).

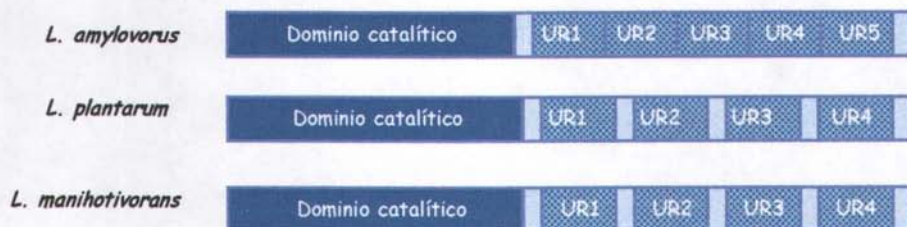


Fig. 6: Esquema de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorus*.

La estructura de la α -amilasa de *L. amylovorus* está constituida por el dominio catalítico, 5UR y 2 unidades ricas en serinas y treoninas; una al final y otra al término de las UR (rectángulos claros). Las α -amilasas de *L. plantarum* y *L. manihotivorus* están constituidas por 4UR y 5 unidades intermedias ricas de serinas y treoninas alrededor de cada una de las UR (rectángulos claros).

Con la finalidad de determinar la función de las UR, se clonó la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* entera y trunca (sin UR) en una cepa de *Lactobacillus plantarum* no amilolítica, observándose que frente al almidón soluble la capacidad de hidrólisis de ambas proteínas no cambiaba notablemente, mientras que sí lo hacía frente al almidón insoluble, ya que sólo la proteína entera era capaz de hidrolizarlo (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000). Lo anterior se observó midiendo la liberación de azúcares reductores y monitoreando por microscopía electrónica de barrido el estado de los gránulos de almidón durante una fermentación de 48 hrs. La fermentación se llevó a cabo para ambas construcciones (α -amilasa entera y trunca) y se tomaron muestras a las 24 y 48 hrs. En la fig. 7A se pueden observar los gránulos de almidón hidrolizados por la enzima entera, mientras que, en la fig. 7B, los gránulos tratados con la enzima trunca se observan intactos. Posteriormente, se decidió estudiar su capacidad de adsorción, encontrándose que la enzima trunca no podía adsorberse y que probablemente ésta era la razón por la que no hidrolizaba el sustrato. De esta manera se concluyó que la α -amilasa de *L. amylovorus* presentaba un dominio de adsorción, constituido por una serie de 5UR independientes del dominio catalítico (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

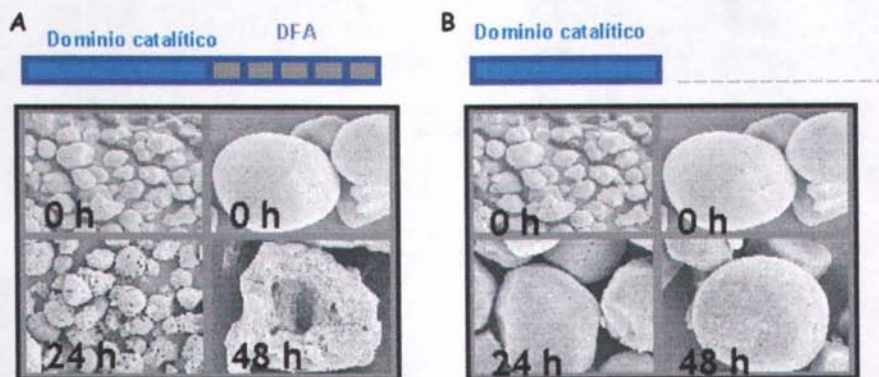


Fig. 7: Fotografías en microscopio electrónico de barrido.

Gránulos de almidón donde se observa la acción de las α -amilasas entera (A) y trunca (B) de *L. amylovorus* a diferentes tiempos (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000).

La relación que existe entre la adsorción de la enzima al sustrato y su hidrólisis, se encuentra ampliamente estudiada en diversas glucosil-hidrolasas como en glucoamilasas (Sorimachi *et al.*, 1997), CGTasas (Lawson *et al.*, 1994) y β -amilasas (Hye-Jin, *et al.*, 1999). Sin embargo, los DFA que se encuentran descritos hasta este momento en su mayoría están constituidos por alrededor de 100 aminoácidos y no presentan unidades repetidas en su secuencia.

Dada la particularidad de estas enzimas se realizó un análisis buscando proteínas similares y se encontró que la α -amilasa de *Streptococcus bovis* posee un dominio catalítico más una y media unidades repetidas (Morlon-Guyot *et al.*, 2001). La α -amilasa de *Bacillus sp.* 195 está constituida por un dominio catalítico más dos unidades repetidas que se pierden durante la fermentación (Sumitani *et al.*, 2000). En una bacteria alcalófila no identificada se encontró una amilasa que contiene tres unidades repetidas e idénticas en el extremo C-terminal, cuya función no ha sido determinada (Candussio *et al.*, 1990). Así mismo, en el extremo C-terminal de las glucosiltransferasas (GTF) del género *Streptococcus* se presentan series de unidades repetidas conservadas; de menor tamaño que las antes mencionadas (65 aminoácidos), diferentes entre si y que le confieren a la enzima la capacidad de adsorberse al glucano (Giffard and Jacques, 1994; Gilmore *et al.*, 1990; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992). También, la toxina B de *Clostridium difficile* está constituida por un dominio catalítico y una serie de múltiples unidades repetidas diferentes y pequeñas, las cuales reconocen a un trisacárido en la célula blanco (Wren, 1991).

Al alinear una de las 5 UR del DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* con otras amilasas (fig. 8), se encontró que la secuencia es similar a los extremos C-terminal de las α -amilasas de *Streptococcus bovis* (contiene dos amilasas, una extracelular y una intracelular), *Clostridium acetobutylicum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacillus subtilis* SUH4-2, *Bacillus subtilis* X-23 y *Bacillus sp.* H-167. En *Bacillus polymyxa* se encuentra un precursor que contiene actividad tanto de α como de β -amilasa. El precursor está dividido por dos unidades repetidas localizadas casi a la mitad de éste. La región 5'

contiene actividad de β -amilasa mientras que la región 3' contiene actividad de α -amilasas (Uozumi *et al.*, 1989). La secuencia de las UR de las α -amilasas de lactobacilos guardan cierta similitud con la de las unidades repetidas del precursor de este microorganismo. También se observó que la secuencia de la bacteria alcalófila no identificada que alinea con la de los lactobacilos no corresponde a la región C-terminal de esta proteína; donde se presentan las unidades repetidas, sino en una región próxima a éstas después del sitio activo de la enzima. Así, en el alineamiento se mostró que una unidad repetida es similar al extremo C-terminal de otras amilasas y que además, en cada una de las UR se encuentran presentes aminoácidos conservados que se han identificado en otras enzimas como importantes para la fijación al almidón insoluble, como son los residuos aromáticos triptofanos (W) (Sorimachi *et al.*, 1997, Lawson *et al.* en 1994, Goto *et al.* en 1994) (fig. 8).

Actualmente, todos estos dominios de fijación al almidón junto con el de las α -amilasas de *L. plantarum* y de *L. manihottivorans* se encuentran clasificados dentro de la familia de los CBM26 (Couthino y Henrissat, 1999) pero sólo en dos casos ha sido probada la capacidad de adsorción al almidón de los péptidos.

```

Lactobacillus amylovorus (Q48502)   TTKK[REK]SS WG SRV[AV]VN - KNTN -- KAITSAW[PKK]K[AL]GNDKYELDLDTDEDDSDLAV[FE]-TD - [TK]QT[PA]NEA[ET]FTADAT[LDQN]GV V
Lactobacillus manihotivorans (Q9XCv8) TTKK[REK]SS WG STVYA[AV]VN - KNTN -- KAITSAW[PKK]K[AL]GNDEYELDLDTDEDDSDLAV[FE]-TD - [TN]QT[PA]NEA[ET]FTADAT[LDQN]GV V
Lactobacillus plantarum (O06915)   TTKK[REK]SS WG SRV[AV]VN - KNTN -- KAITSAW[PKK]K[AL]GHDKYELDLDTDEDDSDLAV[FE]-TD - [TK]QT[PA]NEA[ET]FTADAT[LDQN]GV V
Bacillus sp. H-167 (Q45574)       -----K[REK]DTWG TPHIYY----- ETEPKVEEPSWGSAPEN[EL]VENGWYKYTI -- EGAESARV[PK]K[AG]ANQWPGPGEES[RY]RDQDGFWDG - EWH
Streptococcus bovis (e) (O50583)   ETNI[TR]Q[RD]N W - SEV[AN]M[YS]A KDN --- -KL-LGAW[ET]K[AN]KEASGRYSITVPASYAE[EG]V[K]MT N[NO]Q[SO]Y[Q]NE --- -GDFKAEGL[YS]KA - [GL]M
Streptococcus bovis (i) (O50582)   KTR[ET]D[EG]QWDA - N[AL]L[YG]N - PVQYP-- -LGV W[PE]YADVN ----- A----- K[II] - N[QP]T[SN]Q[PY]SEGFN[LV]K[SG]N[IK]D - [GL]K
Bacillus polymyxa UR2 (P21543)     TNK[ET]V Y[YY]K [GF]N[SP] - [I]H Y RPAGG ----- -SW[PG]V[K]K[Q]DAEISGYAKITVDIGSASQLEAA - -N[II] - [NN]N[WD]S[NN]TKNYL[FS]TGTSTYTP [GS]N
Bacillus polymyxa UR1 (P21543)     GNK[ET]I Y[YY]K [GF]N[SP] - [I]H Y RPAGG ----- -SW[PG]V[K]K[Q]DAEISGYAKITVDIGSASQLEAA - -N[II] - [NN]N[WD]S[NN]TKNYL[FS]TGTSTYTP [GS]N
Bacillus subtilis SUH4-2 (Q9R9H7)  ----IG[QN]P[NH]WSQVNA[ET]K HD G G R A I E L T G S W [PK]K[AN]KNADGIYTLTPADTDTTNAK[EN]N - [SA]Q[V]P[Q]N[Q]P[ET]DYVQNGLYND [GL]S
Bacillus subtilis X-23 (O82953)    ----IG[QN]P[NH]HWGNVNA[ET]K HD G G G A I E L T G S W [PK]K[AN]KNADGIYTLTPANADTADAK[EN]N - [SA]Q[V]P[Q]N[HP]G[E]D -----
Butyrivibrio fibrisolvens (P30269)  [YE]Y[TE]QW[DK]VCA[MT]W ----- -GAT[AL]G[D]W[PK]KEL[Q]DE[DG]W[YS]V[L]PA-GP[SE]D[L]N[II]N - [GN]N -----
Clostridium acetobutylicum (Q97GW3) [VH]E[K]N[S]W[G]A[P]Y[Y]Y ----- -TSSGQ_TGPGW[PK]K[AN]NSDGN[GW]SYTI - NGLSSAKVLE - N[II]KINQTPGRNQP[ET]YDVTGEEW[EN]G[T]W ---
Bacteria alcalófila no identif. (Q03658) ----[TK]K[AD]WGT[PH]IYY----- DTFPEEPEVTWTTAPE[MT]LVEDD[W]Y[Y]V[FE]__ENAESAN[II]K[SS]SGK[IQ]P[GN]EP[ET]FIDQIGW[YG]V[K]WLD
Toxinas (consenso)                 NDG[Y]E ----- G ----- NDG[Y]E ----- G -----

```

Fig. 8: Alineamiento múltiple de una unidad repetida del DFA de *L. amylovorus*. Los aminoácidos idénticos se encuentran resaltados en gris y aquellos que se han relacionado con la unión al sustrato se presentan en negritas. La secuencia consenso de toxinas corresponde a las de *Clostridium* y *Streptococcus* (Wren, 1991). Las claves de cada proteína según 'UniProt: The Universal Protein Resource' (URL: www.expasy.uniprot.org/index.shtml) se encuentran entre paréntesis.

OBJETIVO

Clonar una unidad repetida de las cinco presentes en el Dominio de Fijación al Almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y observar si una unidad es suficiente para obtener la función de fijación al almidón insoluble.

HIPÓTESIS

Considerando la similitud en tamaño y en secuencia primaria de cada una de las unidades presentes en tandem en el dominio de fijación al almidón de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, es posible que una sola unidad repetida sea capaz de adsorberse al almidón insoluble.

METODOLOGÍA

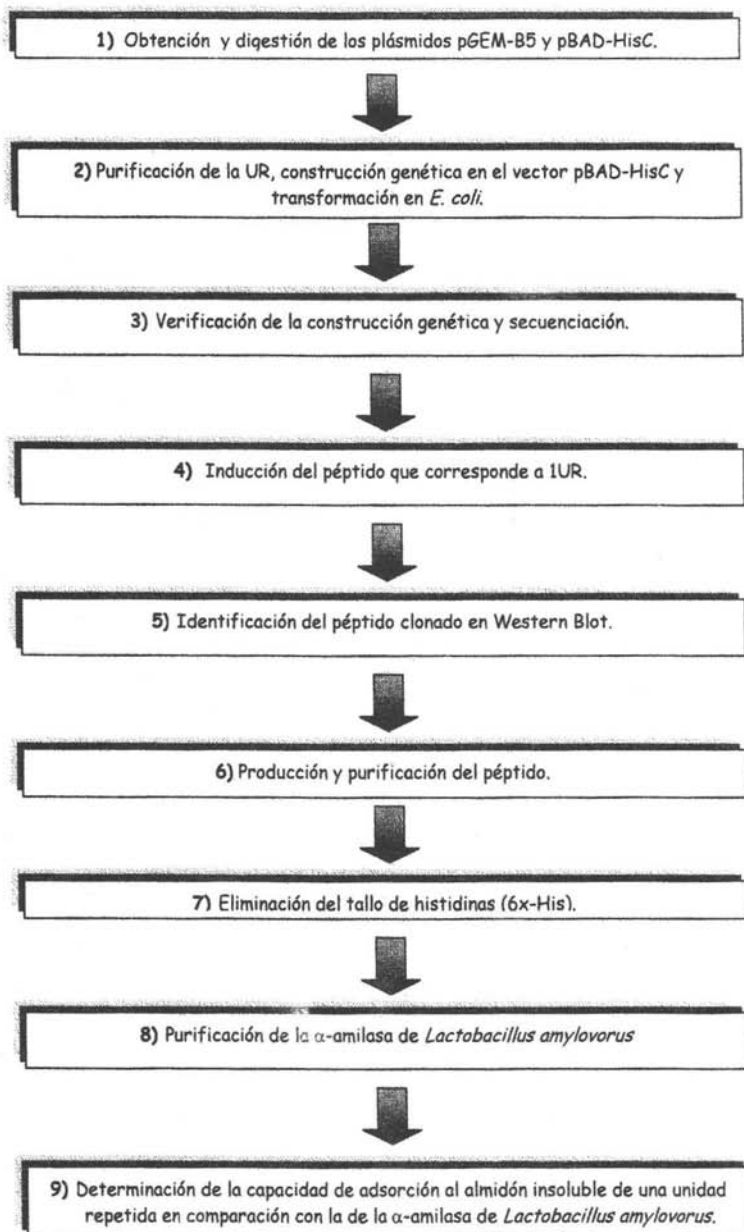


Fig. 9: Diagrama general de la investigación

EXPLICACIÓN DETALLADA DE LA METODOLOGÍA

En trabajos anteriores a éste se amplificó por la reacción de la polimerasa en cadena una de las 5 unidades repetidas de la α -amilasa a partir del ADN total de *L. amylovorus* clonándose posteriormente en un vector especial para PCR; el vector pGEM-T easy (Promega) (fig. 10), el cual fue llamado pGEM-B5 una vez que se comprobó por secuenciación que se encontraba la UR en este vector. El vector pGEM-B5 fue introducido por electroporación (Ausbel *et al.*, 1994) en *Escherichia coli* XL1-Blue.

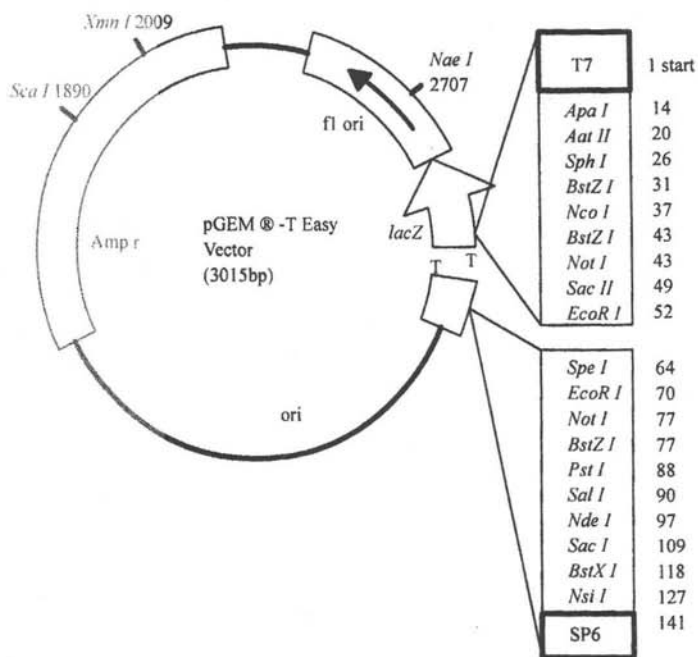


Fig. 10: Mapa del vector pGEM-T-Easy

Las características de este vector se presentan en la siguiente tabla:

Descripción	El vector pGEM-T es un sistema conveniente de clonación para productos de PCR.
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta un sitio múltiple de clonación rodeado por sitios de restricción para las enzimas <i>Bst</i>Z I, <i>Not</i> I y <i>Eco</i>R I que permiten la liberación el inserto. • Los promotores de la ARN polimerasa T7 Y SP6 flanquean el sitio múltiple de clonación con la región que corresponde al péptido de la β-galactosidasa. La activación de este péptido permite detectar a las clonas recombinantes en placas por medio de un indicador colorido. • El origen de replicación f1 permite la preparación de ADN de cadena simple.

La unidad repetida es una secuencia intragénica que no contiene señales de traducción ni de transcripción, por 1^{to} fue necesario subclonarla en un vector de expresión; el vector pBAD-HisC (Invitrogen, fig. 11). Este vector permite la inserción de la UR en el marco de lectura correcto para expresar el péptido y así, determinar su capacidad de adsorción al almidón insoluble.

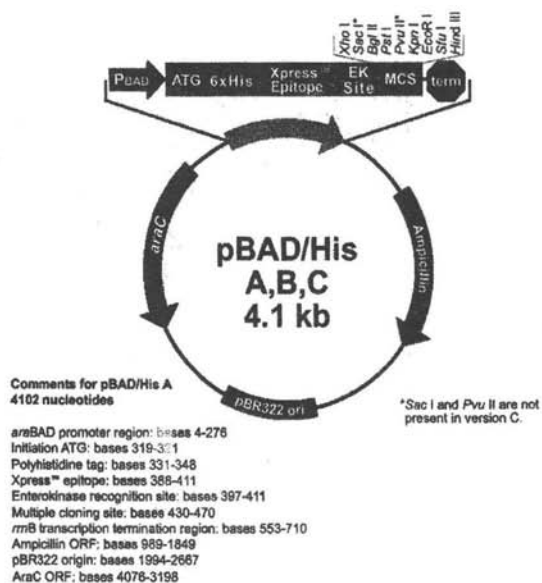


Fig 11: Mapa del vector de expresión pBAD-HisC.

Las características del vector pBAD-HisC se presentan en la siguiente tabla.

Característica	Beneficio
Promotor <i>ara</i> BAD (P _{BAD})	Regula la expresión del gen de interés (Guzmán <i>et al.</i> , 1995)
Sitio optimizado de unión al ribosoma	Incrementa la eficiencia de expresión
Codón de inicio ATG	Provee un sitio de inicio para la transcripción
Tallo de poli-histidinas en el extremo N-terminal	Permite la purificación de la proteína recombinante por afinidad a columnas niqueladas. Además, la presencia del tallo de histidinas permite la identificación de la proteína recombinante con el anticuerpo anti-histidinas por Western Blot.
Epitope Anti-Xpress™ (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys)	Permite la detección de la proteína recombinante con el anticuerpo Anti-Xpress™
Sitio de corte para la enterocinasa (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)	Permite la eliminación del tallo de histidinas
Sitio múltiple de clonación	Permite la inserción del gen de interés para su expresión
Región de terminación de la transcripción <i>rrnB</i>	Sitio de terminación de la transcripción
Gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa)	Permite la selección del plásmido en <i>E. coli</i>
Origen pBR322	Replicación y crecimiento en <i>E. coli</i>
Gen <i>ara</i> C	Codifica la proteína que regula al promotor P _{BAD} (Lee, 1980; Schleif, 1992)

1) Obtención y digestión de los plásmidos pGEM-B5 y pBAD-HisC.

Para la extracción de los plásmidos se crecieron las células de *E. coli* que contenían los vectores pGEM-B5 y pBAD-HisC durante toda la noche, a 37°C, en 100 ml de medio LB con ampicilina (apéndice A.1), inoculando al 1% y con agitación constante a 180 rpm.

La extracción del plásmido se realizó siguiendo la modificación del protocolo de lisis por álcali (Sambrook, *et al.*, 1989) (apéndice B.2) y el estado del plásmido se analizó en una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% (apéndice B.5) (Sambrook, *et al.*, 1989).

El plásmido pGEM-B5 se digirió con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI para liberar al fragmento que contenía la UR y el plásmido pBAD-HisC se digirió con *Bgl* II y *Eco* RI, que cortan al vector de expresión en sitios compatibles con los del fragmento. Las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante y se verificaron en una electroforesis horizontal en geles de agarosa (0.8%) como se describió anteriormente.

Una vez que se comprobó que se habían llevado a cabo las digestiones correctamente se prosiguió a lavar el ADN con fenol: cloroformo y con cloroformo: alcohol isoamílico (método descrito en los pasos

del 11 al 17 de la técnica: midi-preparación de plásmido en el apéndice B.2), resuspendiendo el botón resultante en 80 μ L de agua estéril.

2) Purificación de la UR, construcción genética en el vector pBAD-HisC y transformación en *E. coli*.

Se purificaron tanto la unidad repetida como el vector de expresión cortando los fragmentos correspondientes de un gel preparativo de agarosa y haciéndolos pasar a través de columnas de fibra de vidrio por centrifugación a 6,000 rpm durante 6 minutos, se recuperó el líquido y se centrifugó una vez más con las mismas condiciones (la elaboración de las columnas de fibra de vidrio se encuentra descrita en el apéndice B.3). El líquido recuperado se lavó con fenol: cloroformo y con cloroformo: alcohol isoamílico como se describió anteriormente.

La construcción genética pBAD-UR (pBAD-HisC + UR) se llevó a cabo con ligasa T4 a 4°C durante toda la noche y fue transformada por electroporación (Ausbel *et al.*, 1994), a células competentes de *E. coli* DH5 α (apéndice B.4). En la electroporación las células a transformar se someten a un corto impulso eléctrico de alto voltaje (1250 V). Así, la membrana celular se hace permeable durante un corto período de tiempo y las macromoléculas pueden difundirse dentro de la célula (Sambrook *et al.*, 1989).

3) Verificación de la construcción genética y secuenciación.

Una vez que se llevó a cabo la transformación en *E. coli*, se prosiguió a aislar las colonias obtenidas en placas de medio LB con ampicilina (apéndice A.1). Se aislaron 50 y se realizaron mini-preparaciones (apéndice B.1) de 13 de éstas para obtener el plásmido que contenía la UR (pBAD-UR). Se verificó la presencia del inserto digiriendo al plásmido obtenido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Hind* III.

Las digestiones se verificaron en una electroforesis horizontal en geles de agarosa (0.8%), donde se observó que todas las colonias contenían el inserto, se seleccionaron 2 y se secuenciaron en Laragen (www.laragen.com) por el método de Maxam-Gilbert utilizando los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'd[ATGCCATAGCATTTTTATCC]3' y anti-sentido 5'd[GATTTAATCTGTATCAGG]3'.

4) Inducción del péptido que corresponde a 1UR

La inducción del péptido se llevó a cabo con el inductor del vector; que es L-arabinosa. En este ensayo se probaron diferentes condiciones de inducción para determinar el ambiente óptimo de expresión del péptido de interés. Las bacterias transformadas (*E. coli* / pBAD-UR) se crecieron en medio LB con ampicilina inoculado al 1% y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa durante 12 hrs. Posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de L-arabinosa (0.002%, 0.02%, 0.2%) y se incubó de nuevo en las mismas condiciones. Se tomaron muestras a las 4, 8 y 12 h para lo cual se vació 1.5 ml del cultivo en tubos eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm para eliminar el medio y dejar el botón lo más seco posible. El botón contiene las proteínas que se sintetizaron durante la inducción, las cuales fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Coligan *et al.*, 1995) (apéndice B.6).

5) Identificación del péptido clonado en Western Blot.

En este ensayo, las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se inmovilizaron en una membrana de transferencia (Immobilon-P, Millipore) mediante la aplicación de un campo eléctrico en el equipo para western blot siguiendo las recomendaciones del fabricante (trans-blot, Bio-Rad). Posteriormente se incubaron las proteínas en la membrana con el anticuerpo anti-histidina y se reveló con un segundo anticuerpo acoplado a una fosfatasa alcalina. (apéndice B.7).

6) Producción y purificación del péptido.

Se inocularon 460 ml de medio LB-ampicilina con un pre-cultivo de *E.coli* / pBAD-UR al 1% (apéndice A.1), las células se indujeron con arabinosa al 0.2%, como se describió anteriormente. Para recuperar las células se centrifugó el medio a 4°C, a 10,000 rpm durante 10 minutos, se resuspendió el botón bacteriano en 7 ml de solución TE (apéndice B.1), se trasvasó la suspensión a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y los botones se guardaron a -30°C. Posteriormente, las células guardadas se rompieron por sonicación (apéndice B.8) y el sobrenadante que se recuperó se pasó por columnas de sefarosa niquelada (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia Biotech). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la preparación de las columnas y la purificación del péptido (apéndice B.9).

Para encontrar las condiciones ideales de purificación se probaron diferentes concentraciones de imidazol tanto en el tampón de adsorción como en el tampón de elusión. El imidazol se utiliza como eluyente, ya que compite con las histidinas que contienen un anillo imidazólico en su estructura, que es el responsable de la interacción con el níquel. El tampón de adsorción se probó sin imidazol, con 0.01M y 0.05M de imidazol. El tampón de elusión se probó con 0.25M y 0.5M de imidazol. Además, se probaron diferentes tiempos de adsorción de la proteína a la columna niquelada (1, 5, 10, 20 y 40 minutos). Todas las muestras obtenidas en los diversos ensayos de purificación se analizaron en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

Una vez que se obtuvo la condición ideal de purificación se prosiguió a hacer una purificación en grande de proteína utilizándose 3 L de medio LB. Las muestras obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida.

7) Eliminación del tallo de histidinas (6x-His).

La enterocinasa es una proteasa altamente específica que reconoce la secuencia (Asp)₄ Lys y corta después del residuo de lisina (Anderson *et al.*, 1977); este sitio de corte se encuentra presente en el péptido clonado justo después del tallo de histidinas lo que permitió su eliminación.

Las fracciones que contenían al péptido puro se juntaron y se dializaron (apéndice B.10) contra el tampón de corte para la enterocinasa (tris-HCl 50mM pH 8, CaCl₂ 1mM, tween 20 0.1%). Se concentró la proteína por diálisis inversa cubriendo por completo la membrana que contiene la muestra con sílica gel y se mantuvo a 4°C hasta que el volumen disminuyó a 1 ml.

Posteriormente se digirió la muestra con la enzima enterocinasa (1 unidad / µL). Se digirieron 5 mg de proteína (1UR) con 4, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 unidades de enzima y el análisis de estas digestiones se llevó

a cabo en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. A partir de este ensayo se seleccionó la cantidad de enterocinasa más adecuada y se digirió el resto de la proteína.

La eliminación del tallo de histidinas fue verificada realizando un western-blot como se describió anteriormente.

Una vez que se digirió la UR con enterocinasa se pasó por una columna de sefarosa niquelada para retirar el tallo de histidinas. Posteriormente se dializó el péptido contra tampón citratos/fosfatos 0.0075M a pH 5.

8) Purificación de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Para purificar la enzima se creció a *L. amylovorus* en 1L de medio MRS con almidón (apéndice A.3) toda la noche a 29°C sin agitación. Se centrifugó el medio a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células y el sobrenadante se filtró por papel filtro de 0.45 μ m para eliminar la mayor cantidad de partículas que pudieran interferir en el equipo y por lo tanto en la purificación.

La α -amilasa se purificó a partir del filtrado por cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa- β -ciclodextrina (apéndice B.11) en un sistema FPLC. Inicialmente se montó la columna en el equipo y se estabilizó con tampón citratos/fosfatos 0.01M pH 5, posteriormente se pasó el filtrado por la columna a una velocidad constante de 0.8 ml/min durante 16 hrs. La amilasa se eluyó de la columna con una solución de β -ciclodextrina 8mM disuelta en tampón citratos/fosfatos 0.1M pH 5 y monitoreando la presencia de la enzima por densidad óptica a 280 nm. Una vez que se recuperaron las fracciones que contenían la amilasa, se lavó la columna con tampón de acetatos 0.1M pH 4 y con tampón de boratos 0.1M pH 8. Las fracciones que contenían la amilasa se dializaron (apéndice B.10) con buffer citratos/fosfatos 0.0075M pH 5 para eliminar la β -ciclodextrina y evitar que interfiriese en los ensayos de adsorción. Posteriormente, se concentró la enzima por diálisis inversa como se describió para la unidad repetida en el punto anterior y se verificó su pureza en geles de acrilamida SDS-PAGE al 8%.

9) Determinación de la capacidad del péptido de adsorberse al almidón insoluble.

La capacidad de adsorción al almidón insoluble se determinó tanto para la UR como para la α -amilasa de *L. amylovorus*. A una suspensión de almidón se añaden concentraciones crecientes de proteína. La mezcla se incubó 30 min a 4°C con agitación suave, se centrifugó para eliminar el almidón y se determinó por espectrofotometría (A_{280nm}) la concentración de proteína en el sobrenadante. Para conocer la concentración de proteína adsorbida al almidón, se realizaron blancos, a los cuales no se les agregó almidón pero sí se añadieron las diferentes cantidades de proteína. De tal forma que se conoce la concentración total de proteína con los blancos y la concentración de proteína adsorbida se calcula restando a los blancos la cantidad de proteína que permaneció en el sobrenadante de los tubos con almidón (Williamson, *et al.*, 1992). La constante de adsorción se calcula de la pendiente que resulta de graficar la proteína libre contra la proteína adsorbida / mg de almidón.

RESULTADOS

Como se explicó en la metodología, el plásmido pGEM-B5 contiene 1UR de la α -amilasa de *L. amylovorus*, la cual fue liberada de este plásmido por una digestión con enzimas de restricción y subclonada en el vector pBAD-HisC para expresar la proteína correspondiente y realizar los ensayos de fijación al almidón.

1) Obtención y digestión de los plásmidos pGEM-B5 y pBAD-HisC.

Para liberar al fragmento que corresponde a 1UR se digirió el vector pGEM-B5 con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI. El vector de expresión (pBAD-HisC) se digirió con las enzimas *Bgl* I y *Eco* RI con la finalidad de obtener sitios compatibles con los del fragmento para realizar la ligación. Los sitios *Eco* RI de ambos vectores son compatibles entre si y el sitio *Bgl* I del vector de expresión es compatible con el sitio *Bam* HI del vector pGEM-B5. En la figura 12 se presentan las digestiones de ambos vectores. El vector pBAD-HisC linearizado se observa en los carriles 1 y 2, mientras que en el carril 3 se observa la liberación del fragmento a partir del vector pGEM-B5.

Tanto la UR como el vector de expresión se cortaron del gel de agarosa y se purificaron en columnas de fibra de vidrio. Los fragmentos fueron ligados y la construcción genética se transformó por electroporación en *E. coli* DH5 α .

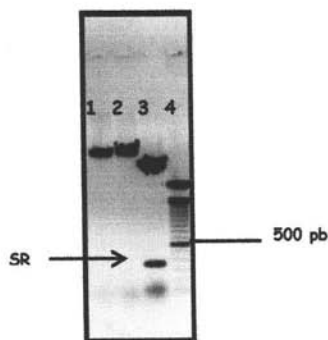


Fig. 12: Gel de agarosa 0.8% donde se observa la digestión de los plásmidos utilizados para la clonación. Carril 1: pBAD-HisC digerido con *Bgl* I, carril 2: pBAD-HisC digerido con *Eco* RI, carril 3: pGEM-B5 digerido con *Eco* RI y *Bam* HI, carril 4: marcador de PM Ladder 100pb (Fermentas).

2) Verificación de la construcción genética.

Las células de *E. coli* DH5 α transformadas se crecieron en placas de medio LB con ampicilina, se aislaron 50 colonias de las cuales a 13 se les extrajo el plásmido pBAD-UR para su análisis de restricción. La construcción genética se digirió con las enzimas *Xho* I y *Hind* III, donde se esperaba una vez más la liberación del fragmento. En la figura 13 se observa la digestión de las colonias 1, 2 y 3.

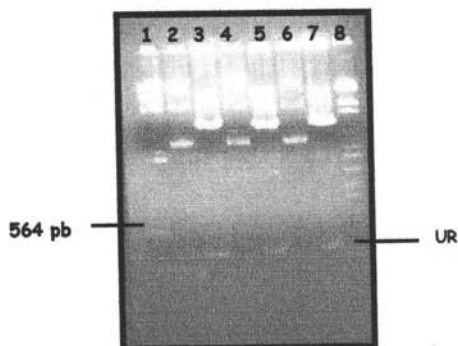


Fig. 13: Gel de agarosa donde se verifica la clonación. Carril 1: marcador de PM λ -*Hind* III (Roche). En los carriles 2, 4 y 6 se presenta al vector de expresión que contiene la UR (pBAD-UR). En los carriles 3, 5, y 7 se observa la digestión del vector pBAD-UR con las enzimas *Xho* I y *Hind* III, donde se observa la liberación del fragmento que corresponde a la UR. En el carril 8 se presenta al marcador de PM IV (Fermentas).

3) Secuenciación.

Para verificar que la unidad repetida se encontraba completa dentro del vector de expresión y en marco de lectura se secuenció el inserto del vector pBAD-UR. Se secuenció en ambos sentidos y se realizó un análisis de secuencia. La secuencia resultante correspondió a la esperada y se presenta a continuación:

ATEGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTAAGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGG
 GATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGATCCGACCTCGAGATCCAACAAGCAGCAGCAGTACA
 ACAACAGAACTAAAAAGSTTTATTTTAAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGT
 TTATAATAAAAAACGAATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAAAAATGACCGCTTTAGGTA
 ACGACGAATATGAATTGGATCTCGACACTGATGAAGATGACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATG
 GGACAAAGCAAACACCAGCAGCTAATGAGGCTGGTTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAA
 ATGGTGTGTAAGAACTTCTGATTCAAGCAGCACATCAAGCAATTCGTAA

Se presenta en negritas la región que codifica para el tallo de histidinas y los codones de inicio y termino de la transcripción están subrayados. Adicionalmente se realizó la traducción teórica de la secuencia anterior, obteniéndose la secuencia que corresponde a una UR con el tallo de histidinas (en negritas).

TRADUCCIÓN TEÓRICA

153 AA; 16.87 kDa

↓ Inicio de la UR

MGGSHHHHHKGASMTGGQMGRLDYDDDDKDRWIRPRDPTSSSSTTTETKKVYFEKPSW*GURVYA
 YVYNK*NTNKAITSAW*PGKKMTALGNDEYELDLDTDEDDSDLAVIFTDGTKQTPAANEAGFTTADATY
 DQNGVVRTSDSSSTSSNS

Nota: *Aminoácidos relacionados con la unión al sustrato

Una vez que se comprobó que el vector de expresión contenía la UR completa y en marco de lectura se realizaron los ensayos de expresión.

4) Inducción del péptido que corresponde a una UR.

Para obtener el péptido de interés se crecieron las células transformadas hasta el inicio de la fase estacionaria y se indujeron con arabinosa; azúcar que funciona como un inductor en el vector de expresión pBAD-HisC ya que contiene el promotor *ara* BAD y el gen *ara* C cuya función es la de regular la expresión del péptido de interés (Schleif, 1992) como se ha descrito en el operon de arabinosa (ver apéndice C). Las concentraciones de arabinosa utilizadas para la inducción fueron 0.002%, 0.02% y 0.2% y se tomaron muestras a las 4, 8 y 12 hrs. Las proteínas sintetizadas se analizaron en geles de poli-acrilamida. En la figura 14 se observa el péptido de interés como una banda más intensa cuando se agrega la mayor concentración de arabinosa (0.2%) (fig. 14, carriles 6, 9, 15 y 19) y también se aprecia que la concentración de éste aumenta con el tiempo, así a las doce horas de inducción es cuando se presenta la banda más intensa que corresponde al péptido de interés (carril 9). De tal manera que las condiciones ideales seleccionadas para producir la proteína fueron: 0.2% de arabinosa con un tiempo de inducción de 12 hrs.

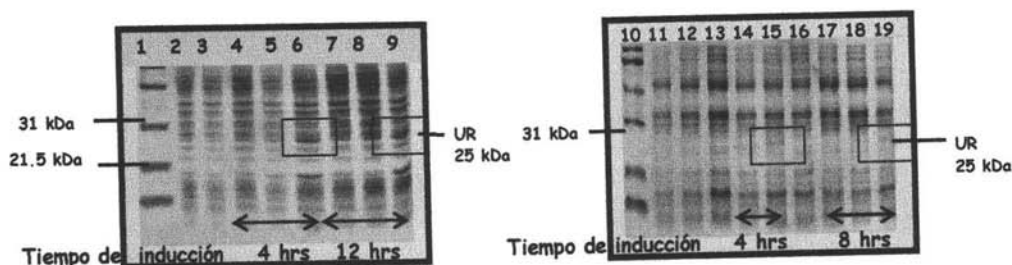


Fig. 14: Geles de poli-acrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Expresión del péptido clonado en la construcción pBAD-UR en *E. coli* DH5 α .

En estos geles se cargaron las proteínas sintetizadas por las células que contienen tanto la construcción pBAD-UR como aquellas que contienen sólo el vector pBAD-HisC (control) en las diferentes condiciones de expresión. Carriles 1 y 10: marcadores de bajo PM (Bio-Rad). Carriles 2 y 11: DH5 α + pBAD-HisC (control negativo). Carriles 3 y 12: DH5 α + pBAD-UR sin arabinosa (control negativo). Carriles 13 y 16: DH5 α + pBAD-HisC + 0.2% de arabinosa e inducidas durante 12 hrs (control negativo). Carriles 4, 7 y 17: DH5 α + pBAD-UR e inducidas con 0.002 % de arabinosa. Carriles 5, 8, 14 y 18: DH5 α + pBAD-UR e inducidas con 0.02 % de arabinosa. Carriles 6, 9, 15 y 19: DH5 α + pBAD-UR e inducidas con 0.2 % de arabinosa.

El tiempo de inducción para las diferentes concentraciones de arabinosa se encuentra indicado con flechas en la parte inferior de los geles.

5) Identificación del péptido clonado en Western-blot.

Adicionalmente a los ensayos de inducción se identificó el péptido de interés por western-blot, ya que el vector de expresión fusiona a la proteína de interés con un tallo de histidinas y se realiza la identificación de ésta con un anticuerpo anti-histidinas. El complejo proteína/anti-histidina es reconocido por un segundo anticuerpo, el α -anti-his el cual está acoplado con la fosfatasa alcalina que en presencia de su sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato o BCIP) da lugar a una reacción colorida que se observa en la membrana como una banda (fig. 15).

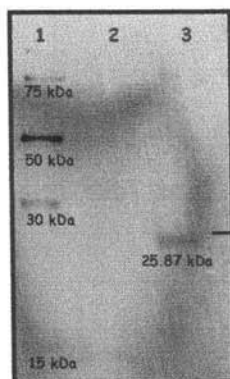


Fig. 15: western-blot.
Identificación del péptido clonado.

Carril 1: marcador de PM con tallo de histidinas (QIAGEN).
Carril 2: proteínas sintetizadas por la bacterias que contienen la construcción pBAD-UR sin inducción (control negativo).
Carril 3: proteínas sintetizadas por las bacterias que contienen la construcción pBAD-UR e inducidas con 0.2% de arabinosa durante 12 hrs. En este último carril se observa la señal que corresponde a la UR con el tallo de histidinas.

6) Purificación del péptido.

Para purificar a la UR se probaron distintas concentraciones de imidazol tanto en el tampón de inicio (sin imidazol, 0.01M y 0.05M) como en el de elusión (0.25M y 0.5M). Además, se probaron diferentes tiempos de incubación de la proteína en la columna niquelada (1, 5, 10, 20 y 40 minutos).

Utilizando el tampón de inicio con 0.05M de imidazol se observó en geles de poliacrilamida que se evitaba la unión de proteínas contaminantes en la columna de sefarosa niquelada, permitiendo así sólo la unión del péptido de interés. El principio de purificación se basa en la afinidad que se presenta entre el anillo aromático de la histina y el níquel de la columna de purificación. El imidazol es un anillo aromático igual al de la histidina de tal forma que compite por la afinidad con el aminoácido siendo posible así la purificación. Una concentración de imidazol de 0.25 M para el tampón de elusión fue suficiente para eluir a la UR de la columna niquelada. Además, se observó que prolongar el tiempo de incubación del péptido en la columna por más de 5 minutos era innecesario, ya que no se observó ningún cambio en la eficiencia al incubar por tiempos más prolongados. Así, las condiciones ideales para purificar la proteína se obtuvieron utilizando el tampón de inicio con 0.05M de imidazol, incubando la muestra en la columna durante 5 minutos y eluyéndola con el tampón de elusión con 0.25M de imidazol.

Las condiciones que permitieron recuperar la mayor cantidad de UR sin proteínas contaminantes se aplicaron para purificar tres litros de medio de cultivo y el gel de poliacrilamida revelado con azul brillante de coomassie (apéndice B6, p. 55) donde se observa la UR purificada se presenta en la figura 16.

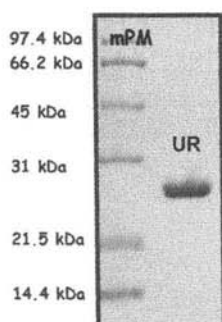


Fig. 16: Gel de poliacrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).
Purificación de la UR.

Carril 1: Marcador de bajo PM (Bio-Rad), Carril 2:
UR pura.

7) Eliminación del tallo de histidinas (6x-His).

Para evitar cualquier posible efecto del tallo de histidinas en la adsorción, éste se debía eliminar de la UR. Para establecer las condiciones se añadieron concentraciones crecientes de enterocinasa (4, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 unidades) a 5 mg de la proteína recombinante. Las digestiones se analizaron en un gel de poliacrilamida. En la fig. 17 se observa en los carriles del 3 al 6 la digestión de la proteína y eliminación del tallo, ya que la talla de ésta disminuye ligeramente, mientras que en el carril 7 se observa la digestión parcial de la proteína como dos bandas, lo cual es de esperarse ya que en esa digestión se agregó la menor cantidad de enterocinasa. La cantidad de enterocinasa mínima necesaria para eliminar el tallo de histidinas fue de 0.01 unidades y se agregó una cantidad poco mayor a ésta (0.05 unidades) para asegurar la eliminación del tallo del resto de la proteína.

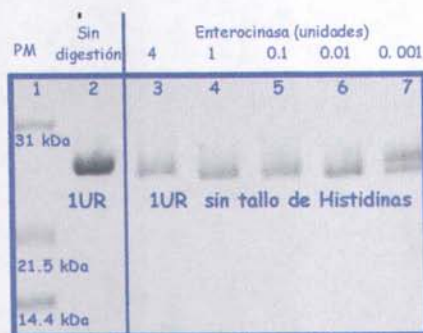


Fig. 17: Gel de poliacrilamida 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Digestión de la UR con la enzima enterocinasa.

Carril 1: marcador de bajo PM (Bio-Rad). Carril 2: UR con el tallo de histidinas sin digestión (control). Carriles 3 al 7: UR digerida con la enzima enterocinasa. Las unidades de enterocinasa empleadas son: 4, 1, 0.1, 0.01, 0.001. En el carril 3 se presenta la digestión con 4 unidades de enterocinasa y la cantidad de ésta disminuye hacia el carril 7 donde se agregó la menor cantidad de enterocinasa (0.001 unidades).

Se realizó un western-blot una vez más con el anticuerpo anti-histidinas de tal forma que se verificó la eliminación del tallo de histidinas de la UR, analizándose tanto la muestra digerida con enterocinasa como la UR con tallo. Los resultados indican que el tallo fue eliminado del péptido ya que no se observó señal en la muestra digerida (fig. 18) mientras que sí se observó para la muestra con tallo que fue utilizada como control.

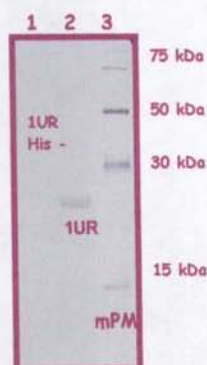


Fig. 18: western-blot. Eliminación del tallo de histidinas.

Carril 1: UR digerida con 0.05 unidades de enterocinasa donde no se observa señal por la eliminación del tallo de histidinas; carril 2: UR con el tallo de histidinas sin digestión con enterocinasa (control positivo) y carril 3: Marcador de PM con tallo de histidinas (QIAGEN).

8) Purificación de la α -amilasa

La α -amilasa se obtuvo de un cultivo de 18 horas de *L. amylovorus*. La enzima se purificó por cromatografía de afinidad utilizando β -ciclodextrina como ligando. La purificación de la amilasa se monitoreó por densidad óptica (Abs_{280}) detectándose sólo una señal durante la elusión que correspondía con la actividad amilolítica. Para verificar la pureza de la proteína se realizó un gel de acrilamida donde se observó una sola banda con el peso aproximado correspondiente al de la α -amilasa.

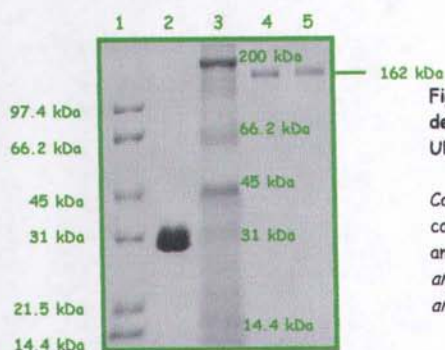


Fig. 19: Gel de poliacrilamida 8% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Purificación de la UR y α -amilasa de *L. amylovorus*.

Carril 1: marcador de bajo peso molecular (BIO-RAD); carril 2: UR; carril 3: marcador de peso molecular de amplio espectro (BIO-RAD); carril 4: α -amilasa de *L. amylovorus* pura sin dializar; carril 5: α -amilasa de *L. amylovorus* pura dializada.

9) Determinación de la capacidad del péptido de adsorberse al almidón insoluble.

El ensayo de adsorción al almidón insoluble se realizó tanto para la UR como para la α -amilasa de *L. amylovorus*. Las proteínas empleadas son las observadas en la figura 19.

Los ensayos de adsorción se realizaron por triplicado para cada proteína, añadiendo diferentes cantidades de ésta a una solución de almidón y midiendo la cantidad de proteína no adsorbida por espectrofotometría (Abs_{280}). La cantidad de proteína adsorbida se obtiene por sustracción. Los valores de absorbancia obtenidos a 280 nm se cambiaron a unidades de concentración utilizando los coeficientes de extinción molar (ϵ) teóricos tanto de la UR como de la amilasa obtenidos en <http://us.expasy.org>. Los resultados se presentan en las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Determinación de la capacidad de adsorción de 1 UR ($\epsilon=26016$ L/Mol $^{\circ}$ cm, PM=13.44 kDa)

Prot inicial Pi (mg/ml)	Prot no ads Pna (mg/ml)	Prot ads Pi-Pna	Prot ads/mg almidón (mg/mg)
10.38	9.27	1.11	1.84
8.81	7.70	1.11	1.85
7.59	6.87	0.71	1.19
6.56	5.38	1.17	1.96
5.07	4.21	0.86	1.43
3.60	3.19	0.41	0.69
2.87	2.53	0.34	0.57
2.34	1.91	0.44	0.73
1.59	1.20	0.39	0.66
0.95	0.64	0.31	0.52
0.48	0.26	0.22	0.37
0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 3: Determinación de la capacidad de adsorción de la α -amilasa de *L. amylovorus* ($\epsilon=207680$ L/Mol $^{\circ}$ cm, PM=10.49 kDa)

Prot inicial Pi (mg/ml)	Prot no ads Pna (mg/ml)	Prot ads Pi-Pna	Prot ads/mg almidón (mg/mg)
8.89	6.76	2.14	3.56
8.06	5.68	2.38	3.96
6.37	4.85	1.52	2.53
4.67	3.69	0.98	1.63
4.21	2.97	1.25	2.08
2.97	2.03	0.94	1.56
2.42	1.52	0.90	1.50
1.47	1.17	0.30	0.50
1.10	0.72	0.38	0.63
0.63	0.39	0.25	0.41
0.00	0.00	0.00	0.00

Los datos de las tablas 2 y 3 se graficaron (gráfico 1) para observar la relación que existe entre la proteína adsorbida y libre (proteína inicial). La constante de adsorción (K_{ad}) corresponde a la pendiente de la línea de tendencia y es un parámetro que nos indica la magnitud de la adsorción de la proteína hacia el gránulo de almidón.

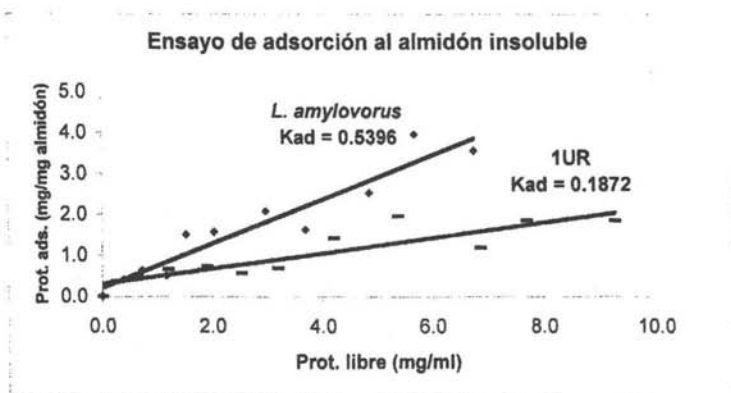


Gráfico 1: Isotermas de adsorción de 1UR y de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

En el gráfico 1 se muestra el comportamiento que presenta la adsorción tanto de la UR como la de la amilasa entera. En ambas curvas se observa que conforme aumenta la cantidad de proteína en el medio también lo hace la cantidad que es adsorbida al gránulo, siendo la K_{ad} de la amilasa entera casi tres veces mayor que la de la unidad repetida.

DISCUSIÓN

A partir del vector pGEM-B5 se obtuvo una de las cinco unidades repetidas (UR) del Dominio de Fijación al Almidón (DFA) de la α -amilasa de *L. amylovorus*, clonándose posteriormente en el vector de expresión pBAD-HisC. Una vez que se verificó la construcción, se probaron diferentes condiciones de inducción para determinar la óptima para expresar al péptido. Adicionalmente se identificó a la proteína por western-blot y se purificó en columnas niqueladas. Una vez purificada la proteína se removió el tallo de histidinas utilizando enterocinasas, de tal forma que no afectara en la adsorción de la UR al almidón.

En los ensayos de adsorción se obtuvo que la UR es capaz de adsorberse al gránulo de almidón, cumpliéndose la hipótesis planteada en este trabajo. En las isotermas de adsorción se observa que conforme aumenta la cantidad de proteína en el medio también lo hace la cantidad que ésta se adsorbe al gránulo de almidón, obteniéndose una $K_{ad} = 0.1872$. La adsorción que presenta la UR frente al almidón insoluble no podría considerarse un efecto azaroso, ya que se tiene el antecedente de que la amilasa sin URs no es capaz ni de hidrolizar el gránulo de almidón ni de adsorberse a éste, lo que se confirmó con isotermas de adsorción que mostraron que la enzima perdía su capacidad de adsorción frente al sustrato insoluble, ya que conforme se aumentaba la cantidad de enzima en la suspensión de almidón también lo hacía la cantidad de ésta en su forma libre (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000).

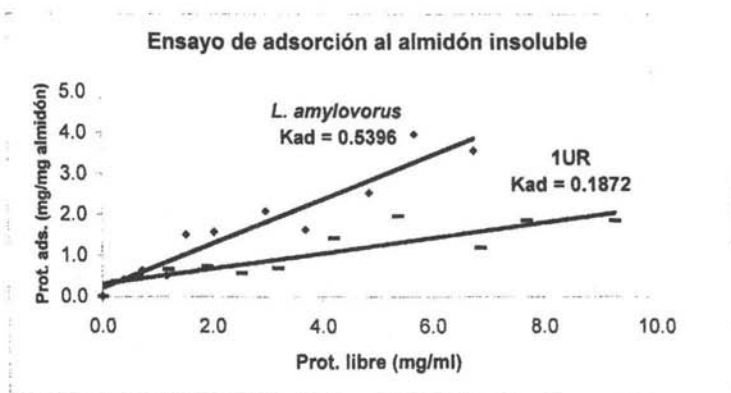


Gráfico 1: Isotermas de adsorción de 1UR y de la α -amilasa de *L. amylovorus*.

En el gráfico 1 se muestra el comportamiento que presenta la adsorción tanto de la UR como la de la amilasa entera. En ambas curvas se observa que conforme aumenta la cantidad de proteína en el medio también lo hace la cantidad que es adsorbida al gránulo, siendo la K_{ad} de la amilasa entera casi tres veces mayor que la de la unidad repetida.

DISCUSIÓN

A partir del vector pGEM-B5 se obtuvo una de las cinco unidades repetidas (UR) del Dominio de Fijación al Almidón (DFA) de la α -amilasa de *L. amylovorus*, clonándose posteriormente en el vector de expresión pBAD-HisC. Una vez que se verificó la construcción, se probaron diferentes condiciones de inducción para determinar la óptima para expresar al péptido. Adicionalmente se identificó a la proteína por western-blot y se purificó en columnas niqueladas. Una vez purificada la proteína se removió el tallo de histidinas utilizando enterocinasas, de tal forma que no afectara en la adsorción de la UR al almidón.

En los ensayos de adsorción se obtuvo que la UR es capaz de adsorberse al gránulo de almidón, cumpliéndose la hipótesis planteada en este trabajo. En las isotermas de adsorción se observa que conforme aumenta la cantidad de proteína en el medio también lo hace la cantidad que ésta se adsorbe al gránulo de almidón, obteniéndose una $K_{ad} = 0.1872$. La adsorción que presenta la UR frente al almidón insoluble no podría considerarse un efecto azaroso, ya que se tiene el antecedente de que la amilasa sin URs no es capaz ni de hidrolizar el gránulo de almidón ni de adsorberse a éste, lo que se confirmó con isotermas de adsorción que mostraron que la enzima perdía su capacidad de adsorción frente al sustrato insoluble, ya que conforme se aumentaba la cantidad de enzima en la suspensión de almidón también lo hacía la cantidad de ésta en su forma libre (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000).

El fenómeno de adsorción inicialmente se caracterizó en la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. *kawachi* (Sorimachi *et al.* en 1997) y en la CGT de *Bacillus circulans* cepa 251 (Lawson *et al.* en 1994) y posteriormente se extrapolaron hacia algunas β -amilasas, una vez que se conocieron las estructuras tridimensionales de dichas enzimas (Hye-Jin *et al.*, 1999; Mikami *et al.*, 1999). En el fenómeno de adsorción se estableció que los residuos más importantes son aquellos que presentan un anillo aromático en su estructura, como el triptofano y que el mecanismo por el cual el DFA interactúa con el sustrato está dado por interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos y las zonas internas de las hélices de amilosa que también presentan cierta hidrofobicidad. Así, el hecho de que la UR posea la capacidad de adsorberse al almidón insoluble puede atribuirse a los residuos de triptofano que presenta en su secuencia, ya que podrían considerarse como equivalentes a los presentes en el sitio 1 de fijación tanto de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* var. *kawachi* como al de la CGT de *Bacillus circulans* cepa 251 como describieron Sorimachi *et al.* en 1997 y Lawson *et al.* en 1994 respectivamente. Estos residuos se encuentran altamente conservados en varias enzimas con DFA y además en la CGT se identificaron como los más importantes para la fijación al almidón insoluble (Penninga *et al.*, 1996). Así, se podría pensar que cada una de las unidades repetidas contienen al menos un sitio de fijación análogo al que se presenta en estas enzimas. En cuanto a un segundo sitio de unión (sitio 2 para la CGTasa y glucoamilasa) es más difícil determinar si existe o no porque los aminoácidos relacionados en éste son más variables. De cualquier forma, para la CGT se ha comprobado que el sitio 1 de unión es el más importante para la adsorción y que el sitio 2 no contribuye sustancialmente ya que su función principal es la de guiar al sustrato hacia el sitio activo (Penninga *et al.*, 1996).

Por otra parte, al comparar la adsorción que presenta la UR (Kad = 0.1872) con respecto a la amilasa entera, se observó que ésta última se adsorbe casi tres veces más que la unidad, presentando una Kad=0.5396. Lo anterior sugiere que conforme aumenta la cantidad de unidades repetidas también lo hace la adsorción de la enzima hacia el gránulo de almidón, lo cual se ha observado en otras proteínas que contienen unidades repetidas, como en la glucosiltransferasa-S de *Streptococcus mutans* que contiene un dominio de fijación al glucano constituido por 5 UR, donde la delección de una unidad repetida disminuyó dramáticamente la capacidad de adsorción de la enzima frente al sustrato insoluble (Lis *et al.*, 1995). Por otro lado, en otro estudio realizado en el laboratorio (Santiago, 2004) se clonó el DFA entero, es decir, las cinco UR sin el dominio catalítico y al medir su capacidad de adsorción se obtuvo que éstas se fijan mucho más al sustrato que la amilasa entera, obteniéndose una Kad = 1 lo cual sugiere que el efecto de las unidades repetidas en la α -amilasa es sumatorio. Asimismo, si se considera que cada una de las UR están constituidas por 100 aminoácidos aproximadamente, como se ha reportado para la mayoría de los dominios de fijación al almidón de las amilasas (glucoamilasas, CGTasas, β y α -amilasa) (Warren, 1996) y que posiblemente se encuentren presentes sitios de unión como los descritos para la CGT y glucoamilasa, se podría sugerir que cada una de las UR de la α -amilasa de *L. amylovorus* está actuando como un DFA independiente y el hecho de que las cinco UR se fijan al sustrato más eficientemente que la amilasa entera podría explicarse como el efecto de un impedimento estérico que ejerce el dominio catalítico en la adsorción de la enzima y quizá no interaccionan los cinco dominios con el sustrato. Lo anterior llevaría a pensar en la necesidad de más de un DFA en la enzima para obtener la capacidad de adsorción.

Asimismo, al alinear el DFA de lactobacilos con la secuencia completa de otras amilasas, se observa que es similar al extremo C-terminal de las α -amilasas de *Streptococcus bovis*, de *Clostridium acetobutylicum* y de varias especies del género *Bacillus* (ver fig. 8, pag. 19). La función del extremo C-

terminal de estas enzimas no ha sido determinada como DFA en estas especies, ya que en la mayoría no se ha estudiado con profundidad la acción de la amilasa. Sin embargo, en *Streptococcus bovis* y de *Bacillus subtilis* X-23 se estudió la capacidad de las α -amilasas para adsorberse al almidón insoluble encontrándose que no son capaces de hacerlo, lo que posiblemente se deba a que el efecto de un solo dominio no es suficiente para conferir a la amilasa la capacidad de adsorción al almidón insoluble. De esta manera se explica la necesidad de los cinco dominios de fijación al almidón en los lactobacilos en cuestión.

La α -amilasa de *L. amylovorus* tiene una identidad de un 98% con las de *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, siendo la principal diferencia que sus α -amilasas contienen sólo cuatro UR idénticas a las de *L. amylovorus*. De tal forma que se podría decir que las α -amilasas de estos tres lactobacilos contienen múltiples DFA idénticos en su estructura (Rodríguez-Sanoja, *et al.*, 2000). Lo anterior es novedoso para la familia de las amilasas, ya que aparte de estos lactobacilos sólo se han reportado dos unidades repetidas en la α -amilasa de *Bacillus* sp. no. 195 (Sumitani *et al.*, 2000) y tres unidades repetidas en la α -amilasa de una bacteria alcalófila no identificada (Candussio *et al.*, 1990). Sin embargo, la particularidad de múltiples dominios de fijación al sustrato no es extraño para otras glucosil hidrolasas, ya que sí se han reportado en celulasas, glucañasas, quitinasas o xilanasas, por ejemplo la β -1,4-glucañasa CenC de *Cellulomonas fimi* contiene 2 dominios de fijación a celulosa idénticos (Creagh *et al.*, 1998), mientras que la quitinasa de *Aeromonas hydrophila* presenta 3 dominios de fijación a quitina (Wu *et al.*, 2001). En cuanto a las UR presentes en la α -amilasa de *Bacillus* sp. no. 195, también podrían considerarse dominios de fijación al almidón, ya que cuando la enzima pierde las UR durante la fermentación también pierde la capacidad de hidrólisis frente al almidón insoluble (Sumitani *et al.*, 2000). Sin embargo, para poder saber si las UR presentes en las amilasas de *Bacillus* sp. no. 195 y de la bacteria alcalófila son DFA, es necesario realizar estudios enfocados directamente hacia la adsorción de la enzima frente al sustrato insoluble, centrándose en el efecto de las UR.

Para determinar los sitios de unión que participan en la adsorción de estos posibles dominios así como los residuos involucrados es necesario realizar estudios donde se determine su estructura secundaria y su interacción con el sustrato. Es por esto que las perspectivas del proyecto son determinar por resonancia magnética nuclear la estructura de este dominio y realizar deleciones de la enzima eliminando 1, 2, 3 y 4 dominios de fijación y observar el impacto sobre la capacidad de hidrólisis y adsorción de la amilasa.

CONCLUSIONES

- ❖ Después de clonar y expresar una de las cinco unidades repetidas del Dominio de Fijación al Almidón de la α -amilasa de *L. amylovorus* se observó que es capaz de fijarse al almidón insoluble.
- ❖ Los resultados de este proyecto sugieren que cada una de las unidades repetidas de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* actúa como un Dominio de Fijación al Almidón, es decir, el dominio no se forma por cinco unidades en tandem sino que existen cinco dominios de unión al carbohidrato.

BIBLIOGRAFIA

1. Abola, E., Sussman, J., Prilusky, J. and Manning, N. 1997. Protein Data Bank archives of three-dimensional macromolecular structures. *Methods Enzymol.* 277:556-571.
2. Agati, V., Guyot, J., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D. 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe an ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85:512-520.
3. Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J. 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzym. Microb. Technol.* 27:406-413.
4. Anderson, L., Walsh, K. and Neurath, H. 1977. Bovine enterokinase. Purification, specificity, and some molecular properties. *Biochem.* 16:3354-3360.
5. Ashikari, T., Nakamura, N., Tanaka, Y., Kiuchi, N., ShiBano, Y., Tanaka, T., Amachi, T. and Yoshizumi, H. 1986. Rhizopus raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* 50:957-964.
6. Ausbel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K., 1994. Current Protocols in Molecular Biology. Edt. John Wiley and Sons, Inc. USA. Vol. I.
7. Bahl, H., Burchhardt, G., Spreinat, A., Haeckel, K., Wienecke, A., Schmidt, B., and Antranikian, G. 1991. α -Amylase of *Clostridium thermosulfurogenes* EMI: nucleotide sequence of the gene, processing of the enzyme, and comparison to other α -amylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1554-1559.
8. Barsby, T., Donald, A. and Fraizer, P., 2001. Starch advanced in structure and function, Edt. MPG Books, UK, pp. 103-109.
9. Bohak, I., Back, W., Richter, L., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Shleifer, K. 1998. *Lactobacillus amyolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. *System. Appl. Microbiol.* 21:360-364.
10. Brauman A., Kéléké, S., Malonga, M., Miambi, E. and Ampe, F. 1996. Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8):2854-2858.
11. Candussio, A., Schmid, G. and Böck, A. 1990. Biochemical and genetic analysis of a maltopentaose-producing amylase from an alkaliphilic gram-positive bacterium. *Eur. J. Biochem.* 191:177-185.
12. Castillo, P., Suarez, G., Gasparian, S. and Morlon-Guyot, J. 1993. Comparison of amyolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus amylophilus*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 40:266-269.

13. Champ, M., Szylił, O., Raibaud, P. and Ait-Abdelkader, N. 1983. Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.* 55:487-493.
14. Coligan, J., Dunn, B., Ploegh, H., Speicher, D. and Wingfield, P. 1995. Current Protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, Inc. U.S.A., Vol I and II.
15. Cornett, C. A. G., Fang, T. Y., Reilly, P. J. and Ford, C. 2003. Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Prot. Eng.* 16:521-529.
16. Cotta, M. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:48-54.
17. Coutinho, P. and Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>.
18. Coutinho, P. and Reilly, P. 1994. Structural similarities in glucoamylases by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng.* 7:749-760.
19. Creagh, A., Koska, J., Johnson, P., Tomme, P., Joshi, M., McIntosh, L., Kilburn, D. and Haynes, C. 1998. Stability and Oligosaccharide Binding of the N1 Cellulose-Binding Domain of *Cellulomonas fimi* Endoglucanase CenC. *Biochem.* 37:3529-3537.
20. Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A., Christensen, S., Borchert, T., Beier, L., Wilson, K., Davies, G. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain 'maltogenic' α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochem.* 38:8385-8392.
21. Davies, G. and Henrissat, B. 1995. Minireview: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Struct.* 3:853-859.
22. De Man, J., Rogosa, M. and Sharpe, E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
23. Díaz-Ruiz, G. 2003. Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. pp. 22-32.
24. Drickamer, K. 1989. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif. *Biochem. Soc. Trans.* 17:13-5.
25. Feese, M., Kato, Y., Tamada, T., Kato, M., Komeda, T., Miura, Y., Hirose, M., Hondo, K., Kobayashi, K. and Kuroki, R. 2000. Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* 301:451-464.

26. Fennema, O., Karel, M., Sanderson, G. and Tannenbau, S. 1996. "Food Chemistry". 3er ed. Edt. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 199-201.
27. Fogarty, W. and Kelly C. 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. In: Wiseman A, editor. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. 3:45-108.
28. Giffard, P. and Jacques, N. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. J. Dent. Res. 73:1133-1141.
29. Gilmore, K., Russell, R. and Ferretti, J. 1990. Analysis of the *Streptococcus downei* gtfS gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. Infect. Immun. 58:2452-2458.
30. Giraud, E. 1993. Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse. Université de Provence, Aix-Marseille I. France.
31. Giraud, E. and Cunny, G. 1997. Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. Gene 198:149-157.
32. Goto, M., Semimaru, T., Furukawa, K. and Hayashida, S. 1994. Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *Kawachi* expressed in *Sacharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 60:3926-3930.
33. Gregory, M. 2005. Biology I Online Textbook. Control of Gene Expression. New York, USA. <http://faculty.clintoncc.suny.edu/faculty/Michael.Gregory/default.htm>.
34. Guzmán, L., Belin, D., Carson, M., and Beckwith, J. 1995. Tight Regulation, Modulation and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. J. Bacteriol. 177:4121-4130.
35. Hamilton, L., Kelly C. and Fogarty, W. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. Biotechnol. Lett. 21:111-5.
36. Harata, K., Haga, K., Nakamura, A., Aoyagi, M. and Yamane, K. 1996. X-ray structure of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Comparison of two independent molecules at 1.8 Å resolution. Acta Cryst. D52 1136-1145.
37. Hardie, J. 1986. Genus *Streptococcus*, p. 1043-1046. En: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams Wilkins, Baltimore.
38. Hayashida, S., Nakahara, K., Kanlayakrit, W. and Teramoto, Y. 1989. Characteristics and function of raw-starch-affinity site on *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase I molecule. Agric. Biol. Chem. 53: 143-149.

39. Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
40. Henrissat, B. and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316:695-696.
41. Hofmann, B., Bender, H. and Schulz, G. 1989. Three-dimensional structure of cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus circulans* at 3.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209:793-800.
42. Hwang, K. Y., Song, H. K., Chang, C., Lee, S. Y., Kim, K. K. Choe, S., Sweet, R. M. and Shu, S. W. 1997. Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol. Cells* 7:251-258.
43. Hye-Jin, Y., Hirata, A., Adachi, M., Sekine, A., Utsumi, S. and Mikami, B. 1999. Structure of the starch-binding domain of *Bacillus cereus* β-amylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9(5):619-623.
44. Itkor, P., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. 1990. Nucleotide sequence of the raw-starch-digesting amylase gene from *Bacillus sp.* B1018 and its strong homology to the cyclodextrin glucanotransferase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:630-636.
45. James, J. and Lee, B. 1995. Cultural conditions for production of glucoamylase from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621. *J. Appl. Bacteriol.* 79:499-505.
46. Janeček, Š. and Ševčík, J. 1999. The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett.* 456:119-125.
47. Janeček, Š., Svensson, B. and MacGregor, E. 2003. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α-amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 270:635-645.
48. Jespersen, H., MacGregor, E., Henrissat, B., Sierks, M. and Svensson, B. 1991. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* 280:51-55.
49. Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T. and Sakano, Y. 1999. Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α-amylase II (TVAII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 287:907-921.
50. Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M. and Matsuura, Y. 1998. Three dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 281:885-897.
51. Kennedy, J., Cabalda, V. and White, C. 1988. Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends in Biotechnology.* 6:184-189.

52. Khoo, S., Amirul, A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N. and Azizan, M. 1994. Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol.* 39:392-398.
53. Kitamoto, N., Yamagata, H., Kato, T., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. 1988. Cloning and sequencing of the gene encoding thermophilic β -amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*. *J. Bacteriol.* 170:5848-5854.
54. Lawson, C., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H., Kalk, K., de Vries, G., Penninga, D., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.* 236:590-600.
55. Lee, N. 1980. Molecular Aspects of *ara* Regulation. In *The Operon*, J. H. Miller and W. S. Reznikoff, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 389-410.
56. Lehtiö, J. 2001. Functional studies and engineering of family 1 carbohydrate-binding modules. Thesis. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, pp. 4-10.
57. Lindgren, S. and Refai, O. 1984. Amyolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57:221-228.
58. Lis, M., Shiroza, T. and Kuramitsu, H. 1995. Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2040-2042.
59. Lyman, E., Li, B., Enganthan, V. 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2976-2980.
60. Mac Gregor, E., Janecek, S. and Svensson, B. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546:1-20.
61. McCarter, J. and Withers, S. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:885-892.
62. Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. and Kakudo, M. 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka amylase A. *J. Biochem.* 95:697-702.
63. Matsuura, Y. 2002. A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of α -amylase family. *Biologia, Bratislava*, 57/ Suppl. 11:21-27.
64. Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R. and Utsumi, S. 1999. Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochem.* 38:7050-7061.

65. Millward-Sadler, S., Poole, D., Henrissat, B., Hazlewood, G., Clarke, J. and Gilbert, H. 1994. Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. *Mol. Microbiol.* 11:375-382.
66. Morlon-Guyot, J., Guyot, J., Pot, B., Jacobe de Haut, I. and Raimbault, M. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 :1101-1109.
67. Morlon-Guyot, J., Mucciolo-Roux, F., Rodríguez-Sanoja, R. and Guyot, J.P. 2001. Characterization of the *L. manihotivorans* α -Amylase. *DNA Seq.* 12 (1):27-37.
68. Nakamura, L. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:56-63.
69. Nakamura, L. and Crowell, C. 1979. *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentations. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:531-540.
70. Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K. and Nishira, H. 1983. Purification and characterization of β -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-S1 Spo II. *Agric. Biol. Chem.* 47:941-947.
71. Nitschke, L., Heeger, K., Bender, H. and Schulz, G. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the β -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain no. 8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:542-546.
72. O'Neill, G., Goh, S., Warren, R., Kilburn, D. and Miller, R., 1986. Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. *Gene.* 44:325-330.
73. Othón, S. 1996. "Química, almacenamiento e industrialización de los cereales". AGT Editor, primera edición, México, pp. 31-34.
74. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Review. Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
75. Penninga, D., van der Veen, B., Knegt, R., van Hijum, A., Rozeboom, H., Kalk, K., Dijkstra, B. and Dijkhuizen, L. 1996. The Raw Starch Binding Domain of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus circulans* Strain 251. *J. Biol. Chem.* 271 (51):32777-84.
76. QUIAGEN. 2005. The QIA express system manual. USA. URL disponible: <http://www.qiagen.com>
77. Quijoch, F. 1986. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 55:287-315.
78. Rashid, N., Cornista, J., Ezaki, S., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. 2002. Characterization of an Archaeal Cyclodextrin Glucanotransferase with a Novel C-Terminal Domain. *J. Bacteriol.* 184:777-784.

79. Rini, J. 1995. Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:551-577.
80. Rodríguez-Sanoja, R. 2001. Contribution à l'étude des relations structure-fonction des α -amylases de lactobacilles. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Sciences des Aliments. Université de Montpellier II.
81. Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N. and Guyot, J. 2000. Comparative Characterization of Complete and Truncated Forms of *Lactobacillus amylovorus* α -Amylase and Role of the C-Terminal Direct Repeats in Raw-Starch Binding. *Appl. Env. Microbiol.* 66:3350-3356.
82. Roissart, H. et Luget, F, 1994, Bacteriés lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques, Edt. Loriga, vol I, pp. 26, 27.
83. Saito, N. 1973. Thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 155:290-298.
84. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, Vol II.
85. Sanni, A., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 72:53-62.
86. Sutiyo, M. 2004. Caracterización molecular del dominio de fijación al almidón de α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Tesis para obtener título de bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. pp. 39-43.
87. Satoh, E., Niimura, Y., Uchimura, T., Kozaki, M. and Komagata, K. 1993. Molecular cloning and expression of two α -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11):3669-3673.
88. Schleif, R. 1992. DNA Looping. *Ann. Rev. Biochem.* 61:199-223.
89. Sen, S. and Chakrabarty, S. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J. Ferment. Technol.* 62(3):407-413.
90. Sherman, J. 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1:3-97.
91. Simpson, C. and Russell, R. 1998. Intracellular α -amylase of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 180(17):4711-4717.
92. Slattery, C. J., Kavakli, I. H. and Okita, T. W. 2000. Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.* 5:291-298.

93. Sorimachi, K., Le Gal-Coëffet, M., Williamson, G., Archer, D. and Williamson M. 1997. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Struct.* 5:647-661.
94. Southall, S., Simpson, P., Gilbert, H., Williamson, G. and Williamson, M. 1999. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* 447:58-60.
95. Sumitani, J., Tottori, T., Kawaguchi, T. and Arai, M. 2000. New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. no. 195 α -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochem. J.* 350:477-484.
96. Sussman, J., Lin, D., Jiang, J., Manning, N., Prilusky, J., Ritter, O. and Abola, E. 1998. Protein data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54:1078-1084.
97. Svensson, B. 1991. Structure function relationships in starch-hydrolases and related enzymes. *Denpun Kagaku.* 38:125-133.
98. Svensson, B., Jespersen, H., Sierks, M. and McGregor, E. 1989. Sequence homology between putative raw-starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from different starch-degrading enzymes. *Biochem. J.* 264:309-311.
99. Svensson, B., Tovborg, J., Mori, H., Bak-Jensen, K., Bønsager, B., Nielsen, P., Kramhft, B., Prætorius-Ibba, M., Nøhr, J., Jøge, N., Greffe, L., Williamson, G. and Driguez, H. 2002. Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biologia, Bratislava*, 57/ Suppl. 11:5-19.
100. Tomme, P., Warren, R. and Gilkes, N. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37:1-81.
101. Uitdehaag, J., Mosi, R., Kalk, D., van der Veen, B., Dijkhuizen, L., Withers, S. and Dijkstra, B. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat. Struct. Biol.* 6:432-436.
102. Uozumi, N., Sakurai, K., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. 1989. A single gene directs synthesis of a precursor protein with beta- and alpha-amylase activities in *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* 17:375-382.
103. Vihinen, M. and Mäntsälä, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Biol. Mol.* 24:329-331.
104. Vihinen, M., Peltonen, T., Litia, A., Suominen, I. and Mäntsälä, P. 1994. C-terminal truncations of thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. *Protein Eng.* 7:1255-1259.

105. von Eichel-Streiber, C., Sauerborn, M. and Kuramitsu H. 1992. Evidence for modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* 174:6707-6710.
106. Vretblad P. 1974. Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. Their cyclo-hexaamylose- β -amylase system. *FEBS Lett.* 47:86-89.
107. Warren, R. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:183-212.
108. Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S. and Tanaka, H. 1994. The roles of C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 176:4465-4472.
109. Williamson, G., Belshaw, N. J. and Williamson, M. P. 1992. O-Glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. *Biochem. J.* 282:423-428.
110. Wren, B. 1991. A family of clostridial and streptococcal ligand binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.* 5:797-803.
111. Wu, M., Chuang, Y., Chen, J., Chen, C. and Chang, M. 2001. Identification and Characterization of the Three Chitin-Binding Domains within the Multidomain Chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. *Appl. Env. Microbiol.* 67:5100-5106.
112. Zabarovsky, E. and Winberg, G. 1990. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acid Res.* 18:5912.

APÉNDICE A
MEDIOS DE CULTIVO

A.1. Medio Luria-Bertani (LB) para crecer a *E. coli* (Sambrook, 1989).

Componente	Cantidad (g/L)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10

Para hacer medio LB sólido en cajas petri se agrega agar al 1.5%.

Para hacer medio LB con ampicilina la concentración final de ésta debe ser de 100 µg / ml.

A.2. Medio SOC para electroporación (Sambrook *et al.*, 1989).

Componente	Concentración	Cantidad (g/L)
Triptona	2%	20.0
Extracto de Levadura	0.5%	5.0
NaCl	10mM	0.584
KCl	2.5mM	0.185
Mg ₂ Cl · 6H ₂ O	10mM	2.03
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10mM	2.46
Glucosa	20mM	3.60

A.3. Medio MRS con almidón para crecer bacterias lácticas amilolíticas (De Man *et al.*, 1960).

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de Levadura	5
Fosfato de Potasio	2
Acetato de Sodio	5
Citrato de Amonio	2
Sulfato de Magnesio	0.2
Sulfato de Manganeso	0.2
Tween 80	1
Almidón	20

Se mezclan todos los componentes excepto el almidón, éste se hidrata previamente con agua destilada y posteriormente se agrega a la mezcla. Se afora y se esteriliza 15 minutos.

APÉNDICE B MÉTODOS

B.1 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA -MINI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO- (Sambrook *et al.*, 1989)

Reactivos necesarios:

- Solución I

Sustancia	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris · Cl (pH 8.0)	25
EDTA (pH 8.0)	10

La solución I se puede preparar en volúmenes de aproximadamente 100 ml y se esterilizan durante 15 minutos y se almacena a 4°C. Esta solución debe ser abierta en campana para evitar su contaminación.

- Solución II

Sustancia	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Esta solución se prepara en el momento. Se pueden utilizar soluciones stock: NaOH 10 N y SDS 10%.

- Solución III

Sustancia	Volumen (ml)
Acetato de potasio 5 M	60
Ácido acético glacial	11.5
Agua	28.5

- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- Solución TE pH 8

Sustancia	Concentración (mM)
Tris · Cl pH 8	10
EDTA pH 8	1

- Endoribonucleasa pancreática (RNasa) 10mg/ml

Procedimiento:

Se parte de 5ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfieren 1.5ml de medio a un tubo eppendorf y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, eliminar el medio de cultivo. El botón bacteriano debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta pasteur que remueve el medio de cultivo remanente.
2. Se resuspenden las células en 100 µL de solución I fría con la ayuda de un vortex.
3. Se agregan 200 µL de solución II recién preparada. Se mezcla invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurarse de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No use vortex. Se mantiene el tubo en hielo.
4. Se agregan 150 µL de solución III fría. Se mezcla invirtiendo el tubo para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano viscoso. Se mantiene en hielo 5 minutos.
5. Se centrifuga a 12 000 rpm por 15 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Se precipita el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hr aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Se centrifuga a 12 000 rpm por 15 minutos. Se retira el sobrenadante.
8. Se lava el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Se centrifuga 15 min a 12 000 rpm, se retira el sobrenadante y se deja secar el botón.
9. Se disuelve el botón en 10 µL de TE + RNasa (la concentración final de la RNasa debe ser 50µg/ml) y se incuba 30 minutos a 55°C.

De la solución resultante de este método se cargaron 3 µL en geles de agarosa para analizar el estado del plásmido.

**B.2. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA
-MIDI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO-
(Sambrook *et al.*, 1989)**

Se utilizan las mismas soluciones que para la mini-preparación de plásmido más las siguientes:

- Fenol : cloroformo 1:1
- Cloroformo : alcohol isoamílico 24:1
- Acetato de sodio 3M pH 5.2
- Proteínasa K 10mg/ml

Procedimiento:

Se parte de 100ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche en a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfiere el medio de cultivo en botellas para centrifuga y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C para recuperar las células y eliminar el medio de cultivo. El botón bacteriano

debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta pasteur que remueve el medio de cultivo remanente.

2. Se resuspende muy bien el botón bacteriano libre de medio en 5ml de solución I fría con la ayuda de un vortex.
3. Se agregan 10ml de solución II recién preparada. Se mezcla invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurarse de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No use vortex. Se mantienen las botellas en hielo.
4. Se agregan 7.5ml de solución III fría. Se mezcla invirtiendo el tubo para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano viscoso. Se mantiene en hielo 5 minutos.
5. Se centrifuga a 12 000 rpm 15 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Se precipita el DNA con 1 volumen de isopropanol durante 1 hr aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Se centrifuga a 12 000 rpm 15 minutos. Se retira el sobrenadante.
8. Se lava el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Se centrifuga 15 min a 12 000 rpm, se retira el sobrenadante y se deja secar el botón.
9. Se disuelve el botón en 0.5ml de TE + RN^{asa} (la concentración final de la RN^{asa} debe ser 10µg/ml) y se incuba 30 minutos a 55°C.
10. Se agrega proteinasa K a una concentración final de 10µg/ml y se incuba 30 min a 55°C.
11. Se agregan 0.5ml de fenol:cloroformo y se emulsiona con la ayuda de un vortex.
12. Se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente y se recupera la fase acuosa (fase superior).
13. Se lava con un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico y se emulsiona con la ayuda de un vortex.
14. Se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente y se recupera la fase acuosa (fase superior).
15. Se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio.
16. Se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente y se tira el sobrenadante.
17. Se lava el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Se centrifuga 15 min a 12000 rpm, se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 100µL de agua estéril.
18. Se incuba a 37 °C para disolver el DNA.

De la solución resultante de este método se cargó 1 µL en geles de agarosa para analizar el estado del plásmido.

B.3.ELABORACIÓN DE COLUMNAS DE FIBRA DE VIDRIO PARA PURIFICAR ADN.

Materiales:

- fibra de vidrio
- tubos eppendorf 1.5ml
- tubos eppendorf 0.5ml

1. Se perfora el fondo del tubo eppendorf de 0.5ml con una aguja.
2. Se rellena el fondo del mismo tubo con medio centímetro de fibra de vidrio aproximadamente, compactándola lo más posible.
3. Este tubo se introduce en el tubo eppendorf de 1.5ml.
4. Se esterilizan las columnas.

B.4. ELECTRO-TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* (Zabarovsky *et al.*, 1990).

En esta técnica es fundamental mantener las células a baja temperatura para asegurar la eficiencia de éstas.

A. Preparación de las células

1. Se inocula al 1% 1 litro de medio LB (ver apéndice A.1) con un cultivo fresco crecido durante toda la noche.
2. Se crecen las células a 37°C con agitación vigorosa hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7 (se obtienen mejores resultados cuando se crecen las células rápidamente).
3. Para colectar las células se centrifuga el medio a 4°C, a 8,000 rpm durante 15 min.
4. Se remueve la mayor cantidad de medio posible y se resuspenden los botones en un total de 1L de agua mega pura, estéril y fría. Se centrifuga como en el paso 3.
5. Se resuspende el botón en 0.5 litros de agua mega pura, estéril y fría. Se centrifuga como en el paso 3.
6. Se resuspende el botón en aproximadamente 20 ml de glicerol al 10% frío y elaborado con agua mega pura. Se centrifuga como en el paso 3.
7. Se resuspende en un volumen final de 1.5 ml de glicerol al 10%. La concentración de células debe ser alrededor de $1-3 \times 10^{10}$ células / ml.
8. Esta suspensión se debe guardar en alícuotas de 50 μ L a -70°C. Las células se conservarán en buen estado por al menos 6 meses en estas condiciones.

B. Electro-transformación

1. Las células guardadas a -70°C se descongelan en hielo y se les agrega de 5pg a 0.5 μ g de ADN.
2. Se mezcla ligeramente y se mantiene en hielo durante 1 minuto.
3. Se establece la magnitud del impulso eléctrico en el equipo para electroporar que debe ser de 1250 V.
4. Se transfiere la mezcla de células con plásmido a una cubeta para electroporación de 0.1 cm (enfriada previamente) con la ayuda de una micro pipeta. Se coloca la cubeta en la cámara del equipo y se da el impulso eléctrico.
5. Inmediatamente después del pulso se agregan a la cubeta 950 μ L de medio SOC (ver apéndice A.2) y se resuspenden rápidamente las células en el medio con una micro pipeta (la adición rápida del medio SOC después del pulso eléctrico es muy importante para maximizar la recuperación de las células transformadas).
6. Se transfiere la suspensión de células a un tubo cónico de 15 ml y se incuba a 37°C durante 1 hora, con agitación constante.
7. Se plaquea en cajas petri con medio LB/ampicilina (ver apéndice A.1) 1, 10 y 100 μ L de la suspensión de células del punto anterior para determinar la eficiencia, la cual debe ser mayor a 1×10^7 transformantes (ufc)/ μ g ADN cuando se tienen plásmidos íntegros.

B.5. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA (0.8%).
(Sambrook *et al.*, 1989)

Reactivos necesarios:

- Agarosa
- Bromuro de etidio 10mg/ml
- Tampón TAE 50 X

Componente	Cantidad
Tris base	242 g
EDTA 0.5 M pH 8	100 ml
Ác. acético glacial	57.1 ml

El pH de este tampón se ajusta a 8.3

El tampón debe ser diluido hasta una concentración 1 x.

- Tampón de carga para ADN 10X

Componente	Concentración
Azúl de bromofenol	0.25%
Xilen cianol	0.25%
Glicerol	30%

El tampón de carga se debe diluir hasta una concentración 1X para cargar las muestras en geles de agarosa.

Procedimiento:

1. Se disuelven 0.6 g de agarosa en 75 ml de agua destilada calentando hasta ebullición durante algunos segundos. La cantidad de gel que se prepara depende del tamaño de la cámara de electroforesis que se va a utilizar.
2. Se agregan 4 µL de bromuro de etidio (0.5µg/ml), se mezcla y se deja solidificar el gel en la cámara con el peine que va a formar los pozos donde se cargan la muestras.
3. Se sumerge el gel en tampón TAE 1X dentro de la cámara de electroforesis y se cargan las muestras de ADN con tampón de carga 1X.
4. Se corre el gel a 70 volts durante 1.5 hrs aproximadamente (hasta que el frente del colorante llegue a $\frac{2}{3}$ partes del final del gel).
5. Las bandas de ADN en el gel se observan con luz ultravioleta.

B.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) (Coligan *et al.*, 1995).

Reactivos necesarios:

- Acrilamida 30%
- Tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- Tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- SDS 10%
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina)
- Persulfato de amonio 10% (se prepara en el momento)
- Tampón de carga para proteínas 4X

Componente	Cantidad
Agua destilada	4 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1 ml
Glicerol	800 μ L
SDS 10%	1.6 ml
2- β -mercaptoetanol	400 μ L
Azul de bromofenol 0.5%(p/v)	200 μ L

La concentración de este tampón debe ser 1X cuando se preparan las muestras.

- Tampón de migración 5X pH 8.3

Componente	Cantidad (g/L)
Tris-base 125 Mm	15
Glicina	72
SDS	5

Este tampón se diluye con agua hasta una concentración 1X para correr el gel de poliacrilamida.

Soluciones para revelar los geles.

- Stock I: azul brillante de coomassie 0.2% + etanol 90%
- Stock II: ácido acético 20%
- Fijación: 40 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + agua destilada 50 ml
- Tinción: 50 ml stock I + 50 ml stock II
- Destinción: 20 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + 70 ml agua

Procedimiento:

1. Se ensambla el sándwich para preparar los geles (0.75 mm de grueso) en el equipo para electroforesis según las recomendaciones del fabricante.
2. Se coloca el sándwich en el casting y se verifica con agua destilada que no haya fugas.
3. Se prepara el gel de acrilamida, el cual está constituido tanto por un gel de separación (parte inferior) como por un gel de concentración (parte superior) y presentan la siguiente composición:

Componente	Gel de separación **		
	Gel de concentración 4%	8 %	12%
Agua destilada	1.21 ml	2.34 ml	1.64 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.50 ml	-	-
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	-	1.25 ml	1.25 ml
Acrilamida 30%	266.5 µL	1.3 ml	2.0 ml
SDS 10%	20.0 µL	50 µL	50 µL
Persulfato de amonio 10%	11.0 µL	50 µL	50 µL
TEMED	2.2 µL	10 µL	10 µL
Total	2.0 ml *	5.0 ml *	5.0 ml *

* Cantidades necesarias para hacer un gel.

** La concentración de acrilamida en el gel de separación depende del peso molecular de las proteínas que se desea separar. Generalmente se usa una concentración de 5% para proteínas de 60 a 200 kDa, una de 10% para proteínas con peso molecular de 16 a 70 kDa y una de 15% para proteínas con peso molecular de 12 a 45 kDa. Así, para el análisis de proteína de éste estudio se seleccionaron los geles de separación con concentración de 12% para la UR (17 kDa) y de 8% para la α -amilasa (100 kDa) (Coligan *et al.*, 1995).

Ambos geles se preparan simultáneamente en recipientes adecuados agregando los componentes en el mismo orden en que se presentan en la tabla. Una vez que se agrega la acrilamida se deben agitar las soluciones ligeramente, después se agrega el SDS quedando pendiente el persulfato de amonio y el TEMED para el momento de vaciar.

Se agrega el persulfato de amonio y el TEMED al gel de separación, se mezcla ligeramente e inmediatamente después se vacía con la ayuda de una pipeta en el sándwich del punto 1 dejando el espacio necesario para colocar el peine que va a formar los pozos sobre este gel. Posteriormente se agrega alrededor de 1ml de agua destilada sobre el gel de separación para obtener una superficie lisa. Se deja a temperatura ambiente alrededor de 20 minutos para permitir la polimerización de la acrilamida. Cuando la acrilamida se ha polimerizado se observa muy ligeramente una línea que separa al gel del agua, cuando esto sucede se retira el agua que se agregó sobre el gel separación, se coloca el peine en el sándwich y se prosigue a agregar el TEMED y el persulfato de amonio al gel de concentración, se mezcla ligeramente la solución e inmediatamente después se vacía con la ayuda de una pipeta en el sándwich sobre el gel de

separación rellenando los espacios que deja el peine y evitando la formación de burbujas. Se deja a temperatura ambiente para permitir la polimerización.

4. Se desmonta el sándwich del casting y se coloca en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. Se agrega tampón de migración 1X a pH 8.3 en la cámara y se retira el peine cuidadosamente.
6. Se conecta la corriente a la cámara y se pre-corre el gel a 20 mA durante 30 minutos aproximadamente.
7. Para preparar las muestras se diluye una porción de la proteína en solución con el tampón de carga para proteínas 1X. Calentar a 95°C durante 5 minutos y poner en hielo hasta que se cargue el gel. Las muestras se cargan en el gel con la ayuda de una micro pipeta después de la pre-corrida.
8. Se corre el gel a 20 mA hasta que la marca de azul de bromofenol llegue hasta el fondo del gel.
9. Se desmonta el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante para recuperar y revelar el gel.
10. Se agrega solución de fijación a la caja petri que contiene el gel hasta cubrirlo completamente. Se mantiene en agitación durante 30 minutos y se decanta.
11. De la misma manera que el punto anterior, se agrega solución de tinción. Agitar durante 20 minutos y decantar.
12. Se agrega solución de fijación una vez más e igual que en los puntos anteriores. Se agita durante 30 segundos y se elimina la solución. A partir de este punto las bandas de proteína son ligeramente visibles en el gel.
13. Se agrega solución de destinción, se agita hasta que el gel pierda su coloración azul y las bandas de proteína sean claramente visibles.

B.7. WESTERN-BLOT (Coligan *et al.*, 1995)

Reactivos y materiales necesarios:

- Tampón de Transferencia 10X

Sustancia	Cantidad (g/L)
Glicina	144
Tris base	30

- PBS 10 X

Sustancia	Concentración (M)
NaCl	1.5
Fosfatos	1

El pH de éste tampón debe ser 7.4.

- Metanol
- Tween 20
- Leche descremada

- Papel filtro¹
- Membrana de transferencia¹
- Fibra Scottch-Bride¹
- 2 recipientes de tamaño adecuado: para activar la membrana para realizar el sándwich

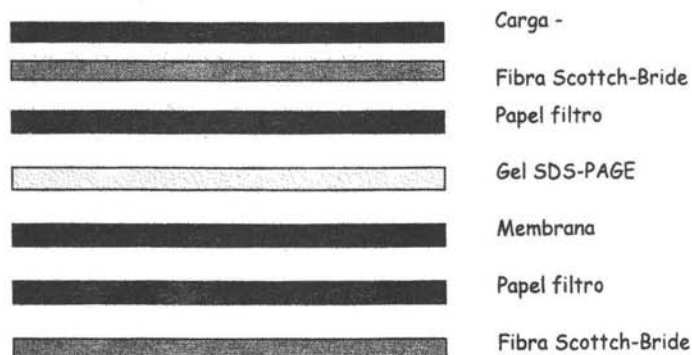
¹ Deben ser del mismo tamaño que el equipo para transferir.

Transferencia

1. Se corren las proteínas que se desean transferir en un gel SDS-PAGE.
2. Una vez que se ha corrido el gel de poliacrilamida se prepara el tampón de transferencia de la siguiente forma:

Tampón de transferencia 10X	100 ml	
Metanol	100 ml	llevar a 1L con agua destilada

3. En un recipiente se agrega una pequeña cantidad del tampón de transferencia, se coloca el equipo para hacer el sándwich con la parte negra (carga -) hacia abajo (adentro del recipiente).
4. Se realiza el sándwich de la siguiente forma:



Antes de realizar el sándwich se activa la membrana sumergiéndola en metanol y los demás componentes se humedecen con tampón de transferencia del punto 2. El sándwich se realiza dentro de un recipiente que contenga tampón de transferencia para evitar que se seque cualquier componente.

Se eliminan las burbujas de aire que puedan existir entre el gel SDS-PAGE y la membrana, desplazando suavemente sobre la membrana una pipeta pasteur.

Se cierra el sándwich y se monta en la cámara que contiene la cantidad de tampón de transferencia necesaria para cubrir el sándwich (la parte negra del sándwich debe coincidir con la parte negra de la cámara). Se siguen las indicaciones del fabricante.

5. Se conecta la cámara y se realiza la transferencia a 60 V durante 1-1.5 h. Se debe evitar que aumente la temperatura, porque la transferencia sería ineficiente. La transferencia se puede realizar en el cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.

6. Se desmonta el equipo, se retira la membrana y se deja secar sobre papel bond. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 hrs. aprox. ó a 37°C durante 1 h.

Reconocimiento con anti-his.

1. Se sumerge la membrana en metanol.

2. Se numeran los pozos con lápiz y en el caso de que no se tenga un marcador de PM con tallo de histidinas, se debe recortar la región donde se encuentre el marcador para ser revelada con azul de bromofenol o técnica similar.

3. Se agrega el anticuerpo monoclonal de ratón que detecta el tallo de histidinas (anti-his₆, Roche) en una concentración de 0.4 µg/ml en el siguiente tampón:

Tampón PBS	1X
Tween 20	0.05%
Leche descremada	3%

4. La membrana se coloca en un recipiente adecuado al tamaño de la membrana, se agrega una cantidad suficiente del tampón anterior que contienen el anticuerpo de tal forma que cubra muy bien la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 1h con agitación ligera. Posteriormente se lava la membrana con PBS 1X tres veces.

5. Se agrega el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (α -anti-his, PerkinElmer) en una concentración 1:5000 de la misma forma que el primero y se incuba durante 1 h con las mismas condiciones. Se lava 3 veces con PBS 1X.

Revelado

1. El segundo anticuerpo (α -anti-his) se encuentra acoplado a una fosfatasa alcalina, lo que permite que se lleve a cabo una reacción colorida cuando se agrega su sustrato, que identifica el complejo de los anticuerpos con el tallo de histidinas. Así, es necesario agregar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) en una concentración de 0.21 g/L con nitroazul de tetrazolio (NBT) en una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/tampón Tris (solución: sustrato BCIP/NBT lista para usar, PerkinElmer) de tal forma que cubra la membrana por completo para que se lleve a cabo la formación del color.

B.8.ROMPIMIENTO DE CÉLULAS POR SONICACIÓN (Coligan *et al.*, 1995).

Se parte de botones bacterianos obtenidos a partir de 100 ml de medio LB inoculado con las células de interés.

En esta técnica se debe cuidar mucho que las muestras permanezcan a una temperatura de 4°C por lo que es necesario mantenerlas en hielo todo el tiempo, ya que de lo contrario las proteínas pueden degradarse.

1. Resuspender el botón bacteriano en 0,6ml del tampón* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
2. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hertz durante 10 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
3. Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y recuperar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 300 µL de tampón* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
5. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hertz durante 20 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
6. Juntar la mezcla del punto anterior con el sobrenadante recuperado en el punto 3.
7. Agregar tritón a una concentración final de 1% e inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 y ajustar a un volumen de 2 ml con tampón*.
8. Centrifugar a 8,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
9. Filtrar el sobrenadante por membrana de 0.45 µm.

* El tampón que se empleó para este estudio fue el tampón de adsorción que se emplea en la técnica de purificación de proteínas recombinantes en columnas de níquel.

B.9.PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN COLUMNAS DE NÍQUEL (Manual Pharmacia-Biotech)

Soluciones necesarias.

- Sulfato de níquel 0.1 M
- Tampón de adsorción y tampón de elusión: contienen los mismos componentes pero varía la concentración de imidazol.

Componente	Concentración (M)
Na ₂ HPO ₄	0.02
NaCl	0.5
Imidazol (tampón de adsorción)	0.05
Imidazol (tampón de elusión)	0.25

El pH se ajusta a 7.4 con ácido fosfórico concentrado.

NOTA: la concentración de imidazol puede variar para los tampones tanto de adsorción como de elusión. En este protocolo se presentan los tampones que se encontraron como óptimos para purificar a la UR.

Preparación de la columna de sefarosa niquelada.

1. Agitar el recipiente que contiene la sefarosa para resuspender el gel.
2. Con una micro pipeta se toman 200 μL de sefarosa y se transfiere a un tubo eppendorf. La capacidad de unión de la sefarosa niquelada es de 5 mg de proteína con tallo de histidinas / ml de gel.
3. Sedimentar el gel por centrifugación a 2300 rpm durante 3 minutos.
4. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y eliminarlo.
5. Agregar 5 volúmenes de agua destilada y agitar durante 5 minutos para resuspender por completo el gel.
6. Sedimentar el gel de la misma forma que en el paso 3.
7. Retirar el sobrenadante y eliminarlo.
8. Agregar 0.5 volúmenes de sulfato de níquel 0.1 M y agitar durante 5 minutos para resuspender por completo el gel.
9. Sedimentar el gel igual que en el paso 3 y eliminar el sobrenadante.
10. Para lavar el gel agregar 5 volúmenes de agua destilada, agitar durante 5 minutos, sedimentar y eliminar el sobrenadante.
11. Repetir el lavado dos veces más.
12. Resuspender el gel en un volumen de tampón de adsorción.

Purificación de proteínas recombinantes con tallo de histidinas usando centrifugación.

1. Agregar la muestra (en tampón de adsorción) a la columna de sefarosa niquelada y equilibrada en tampón de adsorción.
2. Incubar con agitación constante a temperatura ambiente durante 5 minutos. La cinética de unión depende de la proteína y de su concentración.
3. Sedimentar el gel por centrifugación a 2300 rpm durante 3 minutos y guardar el sobrenadante para su análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
4. Para lavar el gel agregar 5 volúmenes de tampón de adsorción, agitar durante 5 minutos, decantar cuidadosamente el sobrenadante y guardarlo para su análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
5. Repetir el lavado dos veces más guardando en cada uno y por separado el sobrenadante para su análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
6. Para eluir la proteína, agregar 2 volúmenes de tampón de elusión, agitar durante 5 minutos, decantar cuidadosamente el sobrenadante y guardarlo para su análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
7. Repetir la elusión 4 veces más guardando en cada una y por separado el sobrenadante para su análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

B.10. DIÁLISIS

Soluciones necesarias:

- NaHCO_3 10 mM
- Na_2EDTA 10 mM
- Etanol 30 %

Preparación de la membrana de diálisis:

1. Remover el tubo de membrana del rollo y cortarlo en tamaños de 15-20 cm con guantes para evitar contaminaciones por microorganismos o lípidos.
2. Hervir por 10 minutos en solución NaHCO_3 10 mM.
3. Hervir por 10 minutos en Na_2EDTA 10 mM. Lavar varias veces las membranas con agua destilada.
4. Almacenar a 4°C en etanol 30% para evitar el crecimiento de microorganismos celulolíticos.

Uso de la membrana de diálisis:

1. Se toma un tubo de membrana de diálisis del etanol, se enjuaga con agua destilada y se coloca una pinza a uno de los extremos.
2. Se rellena la membrana con agua destilada, se toma el extremo sin pinza y se tapa, se oprime para verificar la presencia de agujeros o fugas.
3. Reemplazar el agua de la membrana con la solución a dializar y se coloca la otra pinza.
4. Sumergir el tubo de diálisis en un vaso de precipitado de 4 L que contiene el tampón contra el cual se va a dializar la muestra.
5. La diálisis se lleva a cabo durante 12 hrs aproximadamente con agitación suave a 4°C . El tampón se puede cambiar a las 6 horas dependiendo del volumen de la muestra.
6. Una vez transcurrido el tiempo de diálisis se saca el tubo del tampón y se recupera la muestra con una pipeta.

B.11. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE β -CICLODEXTRINA (Vretblad 1974).

Características del gel: Sefarosa epoxi-activada 6B (Pharmacia Biotech)

Grupos a acoplar: -NH, -OH, -SH

Matriz: Agarosa 6%

Límite de exclusión: 6×10^6 M

Tamaño de la partícula: 45-165 μm

Ligando: carbono 12

Sustitución: 19-40 $\mu\text{mol/ml}$ de gel drenado

Condiciones para el acoplamiento: pH 9-13, 20- 40°C , 16 h-varios días.

Columna: Pharmacia XK16

Diámetro interno: 16mm

Largo: 20mm

Inmovilización de la β -ciclodextrina

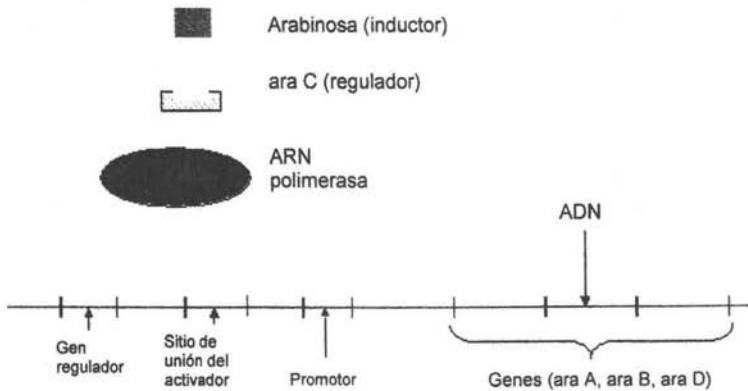
1. Suspender 4 g de sefarosa epoxi-activada 6B en 25 ml de agua destilada (1h).
2. Lavar con agua destilada (1h).
3. Transferir el gel a 25 ml de una solución de NaOH 0.1M y eliminar el exceso de líquido.
4. Agregar el doble del volumen del gel de solución de NaOH 0.1M conteniendo 200 μ mol de β -ciclodextrina (Sigma) por ml de gel. Agitar durante 20 h a 45°C (evitar la agitación magnética).
5. Al final de la reacción: bloquear los grupos activos restantes para lo cual se transfiere el gel a un tampón de etanolamina-HCl 1M pH 8. Dejar a 40-50°C toda la noche.
6. Lavar con agua destilada (30 min).
7. Hacer tres lavados sucesivos con: tampón de acetatos 0.1M pH 4, NaCl 0.5M y con tampón boratos 0.1M pH 8, NaCl 0.5M.
8. Lavar el gel con tampón citratos/fosfatos 0.1M pH 5.5.
9. Cargar el gel en la columna.
10. Conectar y equilibrar la columna en el FPLC.

APÉNDICE C

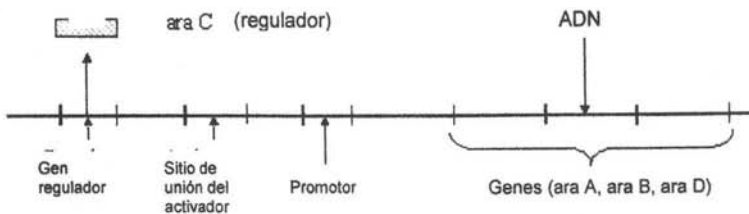
EL OPERON DE ARABINOSA

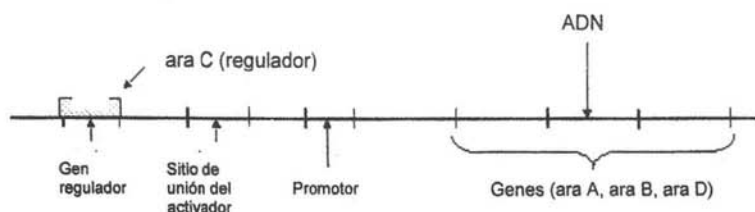
(Gregory, M., 2005)

El operón de arabinosa contiene tres genes diferentes (*ara A*, *ara B* y *ara C*) que codifican para tres enzimas necesarias para convertir la arabinosa en una forma que pueda ser metabolizada. Un cuarto gen codifica para una proteína (*ara C*) que actúa para regular los genes estructurales.

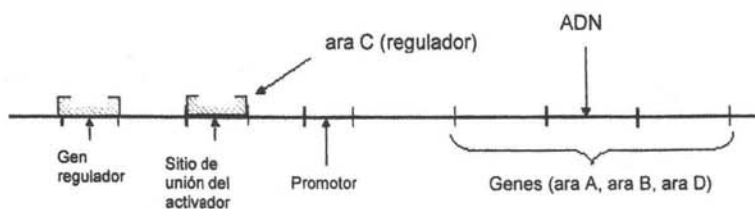


La proteína reguladora (*ara C*) es necesaria para la transcripción de los tres genes estructurales (*ara A*, *ara B* y *ara D*). Ésta se une a su propio gen estructural previniendo su propia transcripción, de tal forma que regula sus niveles. Cuando el nivel de *ara C* es bajo, ocurre la transcripción y se sintetiza más *ara C*.





Ara C también se une a otros sitios del operón, inhibiendo la transcripción de los tres genes estructurales. Por lo tanto los genes normalmente no están activos.



En presencia de arabinosa, ésta se une a ara C provocando que cambie su forma. La forma nueva promueve la unión de la ARN polimerasa al ADN, de tal forma que permite la transcripción.

