

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Estudio del dominio C y de la región C-terminal de la α -amilasa
de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M**

TESIS

Que para obtener el grado académico de:
Maestra en Biotecnología

Presenta:

Sarahí del Carmen Hernández Heredia

Director:

Dra. Sandra T. del Moral Ventura

Co-Director:

Dr. Julián M. Peña Castro

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/008
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 21 de febrero de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la C. Sarahi del Carmen Hernández Heredia, matrícula 15140006, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio del dominio C y de la región C-terminal de la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú


Dr. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Sarahi del Carmen Hernández Heredia
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la **Universidad del Papaloapan**, campus Tuxtepec, bajo la dirección de la **Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura** y el **Dr. Julián Mario Peña Castro** con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 154683.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada (N° de becario 586224), asimismo se agradece también por el apoyo otorgado a través de la convocatoria BECAS MIXTAS 2016-Marzo 2017 para movilidad nacional (N° del programa 291061) y por el apoyo otorgado a través de la convocatoria Programas de Apoyos Complementarios a Mujeres indígenas Becarias CONACYT 2016 (N° del programa 291134).



En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñarán del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe.

Eric Hoffer

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha dado fortaleza para salir adelante.

A mis padres, Cecilia Heredia Narciso y Jorge Hernández Baraja por su amor incondicional, por el apoyo en todos los sentidos, la confianza, por sus sabios consejos y por recorrer conmigo este viaje y cada aventura. Han sido unos excelentes padres. LOS AMO.

A mis hermanos, Jorge Alberto Hernández Heredia y Alain Alberto Hernández Heredia por su amor, confianza, por sus ocurrencias y simplemente por permitirme ser su ejemplo a seguir.

A mis abuelos, Jorge, Alicia, Genaro y Josefina, principalmente a mi Abue Alicia por sus consejos, amor, sinceridad y por esas largas y mágicas historias, porque siempre es y será el pilar de la familia Hernández (si me llegara a faltar, mi mundo se derrumbaría).

A mi bisabuela Carmen Hernández Luna quien guía mi camino desde el cielo.

A mi tía Teresa, por siempre consentirme y recordarme aún en sus últimos días. Los mejores recuerdos son los que más duelen y siempre está presente.

A tí!! Juan P. L. G. por permitirme formar parte de tu vida, eres y serás lo mejor que me ha pasado.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este proyecto, están dedicados a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación.

Mis sinceros agradecimientos están dirigidos hacia la Dra. Sandra T. del Moral Ventura quien es un ejemplo de combinación de conocimientos y disposiciones. Doctora, gracias por formar parte de mi crecimiento profesional y personal. Gracias por el rigor, la confianza, amistad, la inspiración, sinceridad, apoyo y consejos durante estos 6 años. Sé que pude haber dado más y viceversa pero no me arrepiento de las decisiones que tomé, a lo mejor no estuvo personalmente durante la presente tesis, pero nunca me abandonó y todo esto me ayudó para aprender más sobre mí (dicen que no hay que preguntarse el por qué pasan las cosas sino para que pasan) en cuanto a mis debilidades y fortalezas. Hoy le agradezco por los 6 años de trabajo que llegan a su fin. Espero algún día volver a coincidir si así la vida lo dispone.

Al Dr. Julián M. Peña Castro, por confiar en mí, por su apoyo y conocimientos brindados, por aceptar ser mi co-director de tesis durante estos dos años de maestría.

A mi tía Osabel Heredia Narciso por cuidar de mí cuando era pequeña, por formar parte de mi vida en los primeros 6 años, por ir conmigo a los eventos del kínder, por su cariño y apoyo hasta la fecha, por ser mi tía preferida. Gracias!!!

Gracias a mis amigos, compañeros y hermanos que han emprendido este viaje conmigo y han formado parte de mi vida. En especial, gracias a mis amigas: itaty, Violeta, Rebeca, Rosario, Azucena, Alyn, Raquel, Laura, Laura U, Armando N., Juan Ramón y Oscar por sus ocurrencias y amistad brindada.

A Violeta Terrones por ser como una hermana, por la larga amistad desinteresada (13 años) por apoyarme, aconsejarme y por escuchar siempre mis pláticas (tú sabes a que me refiero), por conocer mis debilidades y mis fortalezas.

A Rebeca y Alyn por permitirme formar parte de esa bonita amistad, hoy nuestros caminos se separaron, pero saben que pueden contar conmigo para lo que sea, gracias por apoyarme y aconsejarme durante todo este tiempo.

Agradezco a la Dra. Clarita Olvera Carranza, por permitirme realizar una segunda estancia en su grupo de trabajo, por brindarme sus conocimientos sobre biología molecular, por confiar en mí y por sus consejos.

Al Dr. Julián M. Peña Castro, la Dra. Jacqueline Capataz, Dra. Blanca E. Barrera Figueroa, Dra. Ana Karin Navarro Martínez de la Universidad del Papaloapan por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del comité revisor, Dra. Laura P. Ramírez Contiño, Dr. Andrés Aguirre Cruz, Dr. Edgar García López, Dr. Alejandro Aparicio Saguilán, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dra. Ángela Ávila Fernández, Dra. Blanca E. Barrera Figueroa.

A los profesores que han formado parte de mi formación académica y personal, Dra. Sandra T. del Moral Ventura, Dr. Julián M. Peña Castro, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dra. Clarita Olvera Carranza, Dra. Laura P. Ramírez Contiño, Dr. Andrés Aguirre Cruz y el Dr. Mario Alberto de Jesús Domínguez Magaña.

A todos mis amigos, compañeros y profesores de la UNPA, formaron parte de esta aventura y siempre estarán presente en mis recuerdos.

A la UNPA por ser mi casa durante estos 7 años y darme todas las facilidades para crecer tanto profesional como personalmente, por mis becas y por todo el apoyo recibido.

Dicen que todo lo que empieza tiene que llegar a su fin. Después de 7 años, mi estancia en la **Universidad del Papaloapan** ha concluido, cuando recién entré (parece que fue ayer) no apostaba a nada, no sabía si concluiría la carrera, ni siquiera sabía si haría un posgrado, no tenía idea alguna con que investigador iba a trabajar, parece poco lo resumido, pero, durante ese tiempo aprendí y crecí profesional y personalmente, esto no hubiera sido posible sin el apoyo de la **Dra. Sandra T. del Moral Ventura** debido a su pasión por el área de enzimología logró contagiarme y me permitió formar parte de su grupo de trabajo por más de 6 años. Lo que parecía una rutina al principio después de 7 años descubrí que es mi pasión!.

*Terra ubérrima, mens aperta
Buo Lo-tama, chí jí jú*

Fragmentos de esta tesis fueron presentados en el siguiente congreso y simposio:

1. **Hernández Heredia S**, Olvera Carranza C, Peña Castro Julián M., del Moral Ventura Sandra T. Póster “Estudio del dominio C y del dominio putativo tipo SBD de la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M”. Puerto Vallarta, Jal. 24-30 de Junio del 2017. **XVII Congreso Nacional de Bioingeniería y Biotecnología.**
2. **Hernández Heredia S**, Olvera Carranza C, Peña Castro Julián M., del Moral Ventura Sandra T. Póster “Revisión bibliográfica de la función de la región de unión a almidón (Starch Binding Domain, SBD) de la familia CBM25 y CBM26 en las α -amilasas”. Veracruz, Ver. 6 y 7 de abril del 2017. **Simposio de Biocatálisis BIOCATTEM Impacto de la Biocatálisis en la química de alimentos, farmacéutica, y ambiental.**

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	15
INDICE DE FIGURAS	16
LISTA DE ABREVIACIONES	19
RESUMEN	20
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	22
I. ANTECEDENTES	24
1.1 Almidón: Propiedades, composición y estructura	24
1.1.1 Amilosa	27
1.1.2 Amilopectina	28
1.1.3 Características del almidón comercial Eslab.....	30
1.2 Hidrólisis enzimática del almidón	31
1.2.1 Enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α (1-4)	32
1.2.1.1 Fuentes productoras de α -amilasas.....	34
1.2.1.2 Aplicaciones de las α -amilasas.....	34
1.2.1.3 Propiedades estructurales de las α -amilasas.....	35
1.2.1.4 Características más importantes de cada una de las regiones y dominios de las α -amilasas.....	36
Dominios de unión a almidón.....	39
1.2.1.5 Mecanismo de reacción de las α -amilasas	41
1.3 AmiJ33, α -amilasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	43
II. JUSTIFICACIÓN	45
III. HIPÓTESIS	46
IV. OBJETIVOS	47

4.1 Objetivo general.....	47
4.2 Objetivos particulares	47
V. METODOLOGÍA.....	48
5.1 Modelado de la estructura tridimensional de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M, AmiJ33r	48
5.2 Material biológico.....	48
5.3 Condiciones y medio de cultivo.....	49
5.4 Extracción y purificación del ADN genómico de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	49
5.5 Amplificación de las versiones truncadas de AmiJ33	50
5.6 Electroforesis de ADN.....	51
5.7 Clonación de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	52
5.7.1 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido pJET1.2/blunt	53
5.7.2 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido de expresión pET22b (+)	55
5.7.3 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido de expresión pET101/D-TOPO	56
5.8 Preparación de células electrocompetentes.....	57
5.9 Transformación en <i>E. coli</i>	58
5.10 Escrutinio de las células transformadas	58
5.11 Secuenciación y análisis de secuencias nucleotídicas	59
5.12 Técnicas enzimáticas y bioquímicas.....	59
5.12.1 Ensayo de actividad en cajas Petri de las versiones truncadas de AmiJ33	59
5.12.2 Sobreexpresión y obtención de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC, AmiJ33-AB y el SBD) de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	59

5.12.2.1 Extracción de las proteínas de interés; AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD por el método de choque osmótico	60
5.12.2.2 Extracción de las proteínas de interés; AmiJ33-AB y el SBD utilizando el reactivo Bugbuster 1X	61
5.12.3 Purificación de las versiones truncadas por cromatografía de afinidad	61
5.12.4 Determinación de la actividad enzimática	62
5.12.5 Electroforesis de proteínas	62
5.12.6 Zimograma	63
5.12.7 Caracterización bioquímica de la clona con actividad enzimática, AmiJ33-ABCD	64
5.12.7.1 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de AmiJ33 ABCD de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	64
5.12.7.2 Termoestabilidad y vida media de AmiJ33-ABCD	65
5.12.7.3 Estabilidad en diferentes pHs	65
5.12.7.4 Determinación de parámetros cinéticos V_{max} y K_m	66
5.12.7.5 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando AmiJ33-ABCD	66
5.12.7.6 Cromatografía en capa fina (TLC)	66
5.12.8 Ensayos de adsorción de la región putativa SBD, AmiJ33-ABCD con almidón nativo	67
5.12.8.1 Adsorción del SBD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M en almidón nativo (crudo)	67
5.12.8.2 Adsorción de almidón nativo (crudo) de Maíz	67
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
6.1 Modelado <i>in silico</i> de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	69
6.1.1 Evaluación de la estructura tridimensional de AmiJ33r sin péptido señal	69

6.2 Subclonación y clonación de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	76
6.3 Construcción de las versiones AmiJ33-ABCD y AmiJ33-ABC en pET1.2/blunt y pET22b (+).....	77
6.3.1 Clonación de las versiones AmiJ33-AB y el SBD en pET101D/TOPO.....	80
6.3.2 Análisis de la secuencia de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC, AmiJ33-AB y el SBD)	81
6.4 Ensayo de actividad en cajas Petri de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	87
6.5 Purificación de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB) de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	90
6.6 Caracterización bioquímica de la clona con actividad enzimática, AmiJ33-ABCD ..	93
6.6.1 Efecto de pH sobre la actividad y estabilidad de AmiJ33-ABCD	93
6.6.2 Efecto del pH en la estabilidad de AmiJ33-ABCD.....	95
6.6.3 Efecto de la temperatura y termoestabilidad en la actividad de AmiJ33-ABCD.	96
6.6.4 Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33-ABCD.....	100
6.6.5 Hidrólisis enzimática del almidón comercial y productos de reacción empleando a AmiJ33-ABCD.....	102
6.7 Purificación del SBD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	105
6.8 Región putativa SBD y ensayos de unión a sustrato (almidón nativo).....	107
6.8.1 SBD y adsorción a almidón nativo de papa, marca Eslab y maíz, marca Meyer	107
PERSPECTIVAS.....	111
REFERENCIAS	112
ANEXO I. Secuencia de aminoácidos de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M, AmiJ33 (sin péptido señal).	118
ANEXO II. Curva de calibración de glucosa y BSA	119

ANEXO III. Curva de linearización para la obtención del peso molecular (PM).....	120
ANEXO IV. Curva de linearización para la obtención del peso molecular (PM).....	121
ANEXO V. Fórmula para calcular las concentraciones y volúmenes de ligación en molaridad y relaciones molares determinadas.	122
ANEXO VI. Marcadores de peso molecular para DNA y para proteínas.....	124
ANEXO VII. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.....	125

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje amilosa-amilopectina de almidones de diferentes fuentes botánicas ..	25
Tabla 2. Efecto del SBD en la actividad enzimática de algunas α -amilasas	41
Tabla 3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y genotipos	48
Tabla 4. Medio YENB	49
Tabla 5. Medio LB	49
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de las versiones truncadas	50
Tabla 7. Componentes de PCR	51
Tabla 8. Condiciones de PCR	51
Tabla 9. Componente del TAE 1X	52
Tabla 10. Medio YT2X	58
Tabla 11. SDS-PAGE copolimerizado con almidón	64
Tabla 12. Construcciones y tamaño de los productos de PCR de las versiones truncadas..	77
Tabla 13. Vida media de la α -amilasa AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33 de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	100
Tabla 14. Efecto del SBD de AmiJ33r de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M y otras α -amilasas con estructuras similares	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una molécula de almidón, composición química; amilosa (enlaces glucosídicos α -1-4) y amilopectina (enlaces glucosídicos α -1-6).	25
Figura 2. Estructura complejo amilosa-yodo.....	27
Figura 3. Estructura de la amilopectina.	28
Figura 4. Morfología de los gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas.	30
Figura 5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de los gránulos del almidón comercial Eslab.	31
Figura 6. Sitio de hidrólisis de diferentes α -amilasas sobre la molécula de almidón.....	33
Figura 7. Estructura primaria y diferencia de peso molecular de diversas α -amilasas.	36
Figura 8. Propuesta de la vía de secreción de la α -amilasa de <i>Bacillus</i>	37
Figura 9. Estructura 3D de la α -amilasa, <i>B. amyloliquefaciens</i> P00692 (PDB: 3BH4)	38
Figura 10. Estructura 3D de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> P00692, estructura TIM barrel (PBD: 3BH4).....	39
Figura 11. Representación de familias de CBM que contienen SBD (UniProt y SMART).	40
Figura 12. Mecanismos de reacción de las glucosil hidrolasas.	42
Figura 13. Representación de la estructura primaria de AmiJ33r	44
Figura 14. Estrategia de clonación de las versiones truncadas.....	53
Figura 15. Plásmido pJET1.2/blunt utilizado en el presente trabajo.....	54
Figura 16. Plásmido pET22b (+) utilizado en el presente trabajo.....	56
Figura 17. Mapa y características del vector pET101/D-TOPO	57
Figura 18. Estructura tridimensional, modelada por I-TASSER y diagrama de Ramachandran.	69
Figura 19. Estructura tridimensional, modelada por SWISS-MODEL y secuencia aminoacídica de AmiJ33r.	70
Figura 20. Estructura tridimensional, modelada por Raptor X y diagrama de Ramachandran	72
Figura 21. Modelo 3D de las versiones truncadas de AmiJ33r, diseñados en PyMol	73
Figura 22. Estructuras (dominios) de las versiones truncadas de AmiJ33r.....	74

Figura 23. Análisis del SBD (CBM25) de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	75
Figura 24. Productos de PCR para la construcción de las versiones de AmiJ33	76
Figura 25. Clonación de la versión truncada AmiJ33-ABCD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	78
Figura 26. Clonación de la versión truncada AmiJ33-ABC de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	78
Figura 27. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-ABC de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	79
Figura 28. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-ABCD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	79
Figura 29. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-AB de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M en pET101D/TOPO.....	80
Figura 30. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la región SBD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M en pET101D/TOPO.	81
Figura 31. Secuencia y proteína codificante de AmiJ33-ABCD.....	83
Figura 32. Secuencia y segmento codificante de la clona ABC.....	84
Figura 33. Secuencia y proteína codificante de AmiJ33-AB	85
Figura 34. Secuencia y proteína codificante del SBD.....	86
Figura 35. Muestras recolectadas del sobrenadante de las versiones truncadas de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M inducidas con IPTG.....	88
Figura 36. Prueba de actividad de AmiJ33-ABCD (0.5mM IPTG) en caja Petri con almidón 10 g/L.....	89
Figura 37. Efecto de la concentración del inductor IPTG sobre la actividad α -amilasa (AmiJ33-ABCD) de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	89
Figura 38. Estructura 3D de AmiJ33-AB.....	91
Figura 39. Zimograma de la versión truncada (AmiJ33-ABCD) de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	92
Figura 40. Zimograma de la versión truncada (AmiJ33-AB) de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	92
Figura 41. Efecto de pH sobre la actividad de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*).....	94

Figura 42. Efecto de pH en la estabilidad de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*).	96
Figura 43. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*).	97
Figura 44. Termoeestabilidad sobre la actividad de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	99
Figura 45. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33-ABCD de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	101
Figura 46. Comparación del comportamiento de la producción de azúcares reductores empleando la α -amilasa (AmiJ3-ABCD y AmiJ33) de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.	102
Figura 47. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de AmiJ33-ABCD empleando como sustrato almidón gelatinizado (10 g/L)	104
Figura 48. Zimograma del SBD de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.	106
Figura 49. Ensayos de unión a almidón de papa con la versión truncada AmiJ33-ABCD, SBD y BSA.....	108
Figura 50. Ensayos de unión a almidón de maíz con la versión truncada AmiJ33-ABCD, SBD y BSA.....	109

LISTA DE ABREVIACIONES

aa	Aminoácidos
AmiJ33	α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M
AmiJ33r	α -amilasa recombinante de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M
AmyJ33	Gen de la α -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M
Asp	Ácido aspártico
CAZy	Enzimas Carbohidrato-activas
CBM	Módulo de unión a carbohidrato
DNS	Ácido 3',5'-dinitrosalicílico
Glu	Ácido glutámico
GP1	Glucosa
GP2	Maltosa
GP3	Maltotriosa
GP4	Maltotetraosa
GP5	Maltopentosa
GP6	Maltohexosa
GP7	Maltoheptosa
K_m	Constante de Michaelis Menten
pH	Potencial de hidrógeno
SBD	Sitio de unión a almidón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC-SRP	Vía de secreción de proteínas
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
V_{max}	Velocidad máxima
WT	Nativo

RESUMEN

Las α -amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α (1-4) o α (1-6) de la molécula del almidón, para generar principalmente productos como glucosa y maltosa. Las α -amilasas tienen aplicaciones en distintas industrias como la textil, alimentaria, limpieza, papelera y de biocombustibles. En trabajos anteriores se aisló de suelos cultivados con caña de azúcar la cepas *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M que produce una α -amilasa, AmiJ33 (50 kDa). Su análisis referente al peso molecular indicó que contiene un dominio A/B y uno C, sin embargo, en la secuencia de ADN genómico de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se encontró un gen que codifica para una α -amilasa de 72 kDa. El análisis de la secuencia indicó que AmiJ33r está conformada por un péptido señal, una región de transición, un dominio A/B, un dominio C y una región extra, que contiene un dominio D y E. Un estudio preliminar indicó que la región extra del C-terminal tiene un efecto positivo en la termoestabilidad a 50 y 60°C, en la estabilidad a pHs alcalinos, pero efecto negativo en la eficiencia catalítica y en la actividad en almidón soluble (12 veces y 17 veces menores). Además, la presencia de la región C-terminal evitó la degradación del almidón nativo a pesar de contener una región putativa de unión a almidón (CBM26). En el presente trabajo se realizó la clonación de las siguientes versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M: AmiJ33-ABCD, AmiJ33-AB y el SBD. AmiJ33-ABCD sólo hidrolizó almidón gelatinizado, AmiJ33-AB y el SBD no presentaron actividad amilolítica. La eliminación del SBD afectó negativamente la estabilidad a pH y la termoestabilidad, como se había especulado, sin embargo, mejoró la eficiencia catalítica 2.3 veces y produjo glucosa, maltosa, maltotriosa y de manera interesante a maltotetraosa, un carbohidrato con actividad prebiótica. Por otro lado, el SBD se adsorbe a sólo el 10% y 17% en almidón nativo de papa y maíz, respectivamente. A partir de estos resultados se concluye que el SBD tiene efecto positivo en AmiJ33 al aumentar la especificidad del sustrato, incrementar la estabilidad a pH alcalinos así como la termoestabilidad de la enzima. Es posible que el dominio D evite la degradación del almidón nativo. Es necesario realizar experimentos para determinar la funcionalidad del SBD en la función catalítica de AmiJ33.

SUMMARY

The α -amylases are enzymes that catalyze the hydrolysis of the $\alpha(1-4)$ or $\alpha(1-6)$ glycosidic bonds of the starch molecule, to generate mainly products such as glucose and maltose. The α -amylases have applications in different industries such as textiles, food, cleaning, paper and biofuels. In previous work, *B. amyloliquefaciens* JJC33M, which produces an α -amylase, AmiJ33 (50 kDa), was isolated from soils cultivated with sugarcane. Its analysis regarding molecular weight indicated that it contains an A / B and a C domain, however, in the genomic DNA sequence of *B. amyloliquefaciens* JJC33M a gene encoding a 72 kDa α -amylase was found. Sequence analysis indicated that AmyJ33r is comprised of a signal peptide, a transition region, an A / B domain, a C domain and an extra region, which contains a D and E domain. A preliminary study indicated that the extra region of the C-terminal has a positive effect on the thermostability at 50 and 60 ° C, on the stability at alkaline pH, but negative effect on the catalytic efficiency and on the activity in soluble starch (12 times and 17 times lower). In addition, the presence of the C-terminal region prevented the degradation of the native starch despite containing a putative starch-binding region (CBM26). In the present work, the following truncated versions of the α -amylase of *B. amyloliquefaciens* JJC33M were made: AmyJ33-ABCD, AmyJ33-AB and SBD. AmyJ33-ABCD only hydrolysed gelatinized starch, AmyJ33-AB and the SBD did not exhibit amylolytic activity. The elimination of the SBD negatively affected the pH stability and the thermostability, as had been speculated, however it improved the catalytic efficiency 2.3 times and produced glucose, maltose, maltotriose and interestingly to maltotetraose, a carbohydrate with prebiotic activity. On the other hand, SBD is adsorbed to only 10% and 17% in native potato and corn starch, respectively. From these results it is concluded that the SBD has a positive effect on AmyJ33 by increasing the substrate specificity, increasing the stability at alkaline pH as well as the thermostability of the enzyme. It is possible that domain D prevents degradation of native starch. It is necessary to perform experiments to determine the functionality of the SBD in the catalytic function of AmyJ33.

INTRODUCCIÓN

Las α -amilasas son enzimas que degradan el almidón, generando diversos productos como la glucosa, maltooligosacáridos y otros compuestos por unidades de glucosa. Estas enzimas son de gran importancia en el área de la biotecnología y tienen aplicaciones industriales que van desde la alimentaria, la fermentación, la industria textil y la industria papelería. Las α -amilasas se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo plantas, animales y microorganismos, las enzimas microbianas generalmente satisfacen las demandas industriales. Hoy en día un gran número de α -amilasas microbianas están disponibles comercialmente y han sustituido casi por completo la hidrólisis química de la industria de procesamiento de almidón (Moreno *et al.*, 2009).

Los principales microorganismos productores de α -amilasas son *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *Aspergillus sp.* (Vihinen *et al.*, 1987) comúnmente aislados de bagazos, compostas y suelos (Boyer y Shanon, 1987). Por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M produce una α -amilasa, AmiJ33 (50 kDa) que contiene un dominio A/B y uno C, y actúa sobre almidón nativo y gelatinizado. La caracterización del gen que codifica para AmiJ33r (*amyJ33S*) indicó que la enzima tiene un peso molecular de 72 kDa, y dominios extras en la región C-terminal, dominio D y E. La caracterización de la α -amilasa recombinante (AmiJ33r) mostró diferencias importantes respecto a la nativa, como la incapacidad de hidrolizar almidón nativo, y la disminución de la eficiencia catalítica y la actividad enzimática, 12 y 17 veces, respectivamente. Por otra parte, la recombinante fue más estable a pHs alcalinos e incrementó su termoestabilidad a 50 y 60°C (Montor-Antonio *et al.*, 2017). En la región C-terminal extra (dominio E) se localizó una región putativa de unión a almidón (SBD) cuya función en AmiJ33r se desconoce. En la bibliografía se ha documentado que el dominio C algunas veces tiene efecto en la actividad amilolítica, pero en el caso particular de AmiJ33 no se ha determinado su función.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento de la función de las regiones extras (dominio D y E) de la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M y su implicación en la catálisis, en este trabajo se construyeron versiones truncadas, donde les fue eliminado el dominio E (AmiJ33-ABCD) y la región C-terminal (AmiJ33-AB), y se evaluó la funcionalidad del dominio E (SBD). Las versiones truncadas con potencial actividad

enzimática se evaluaron en términos bioquímicos, cinéticos, y en la generación de los productos de hidrólisis a partir del almidón. El SBD se analizó en su capacidad de adsorción en almidón nativo.

I. ANTECEDENTES

1.1 Almidón: Propiedades, composición y estructura

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas, es una fuente de energía para muchos organismos y representa una fracción importante (60-80% w/w) en un gran número de productos agrícolas como: tubérculos (papa y yuca), cereales (maíz, trigo, arroz) y leguminosas (frijoles, chícharos y habas) (Bello y Paredes, 1999). El almidón también tiene una gran importancia calórica para los seres humanos y se ve reflejada en los alimentos que consumimos. Además, el almidón y sus derivados también son esenciales en sectores industriales, tales como alimentario, textil y de papel (Belitz y Grosch 1988).

El almidón se presenta en forma de gránulos, que habitualmente se caracterizan por adoptar una forma redonda, irregular, con tamaños que van desde 2 y 100 μm . Tanto la forma como el tamaño de los gránulos son característicos de la fuente botánica y pueden utilizarse para identificar su origen (Coultate, 1997).

Químicamente, el almidón está integrado por dos polímeros de glucosa de diferente estructura, la amilosa y la amilopectina, y estas forman la estructura semicristalina de sus gránulos (Fig. 1). El contenido de amilosa y amilopectina varía según la fuente botánica y suele estar comprendido entre el 17 y el 35% w/w, respectivamente (Munck *et al.*, 1988). La tabla 1 muestra la composición química de diversos almidones.

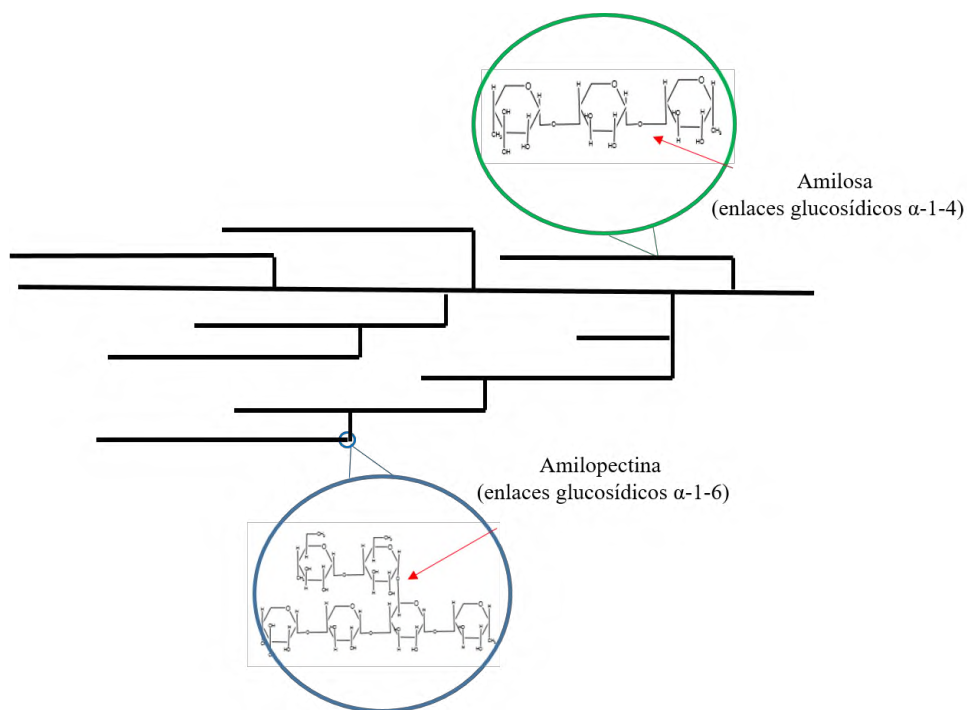


Figura 1. Estructura de una molécula de almidón, composición química; amilosa (enlaces glucosídicos α -1-4) y amilopectina (enlaces glucosídicos α -1-6).

Tabla 1. Porcentaje amilosa-amilopectina de almidones de diferentes fuentes botánicas

Fuente botánica	Amilosa (%)	Amilopectina (%)	Referencia
Maíz	28.3	71.7	Hernández-Medina <i>et al.</i> , 2008
Yuca	17	83	Hernández-Medina <i>et al.</i> , 2008
Papa (Almidón comercial)	27.8	72.2	Hernández-Heredia y del Moral S, 2016
Avena	27	73	Belitz and Grosch, 1988
Arroz	18	82	Belitz and Grosch, 1988

Se le conoce como almidón nativo cuando la amilosa y la amilopectina se encuentran intactas (sin degradación). Este tipo de almidón forma una suspensión temporal de grandes partículas, los gránulos del almidón, que son insolubles en agua fría debido a la fuerza de

cohesión de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas. Con el paso del tiempo, los gránulos del almidón se depositan en el fondo del recipiente. Durante este proceso, los gránulos del almidón incorporan una muy pequeña cantidad de agua, por lo general, la formación de la suspensión provoca un cambio mínimo en la estructura del almidón. Sin embargo, a medida que la temperatura se eleva hasta la temperatura inicial de gelatinización, el almidón comienza a absorber agua (Vaclavick, 2003). La gelatinización corresponde a los fenómenos de hinchamiento irreversible y solubilización cuando los gránulos de almidón se calientan a temperaturas superiores a 60°C en presencia de exceso de agua. Cabe mencionar que las temperaturas iniciales de gelatinización son características de cada tipo de almidón, por lo general se encuentran en un intervalo entre 55-70°C. Cuando se ha sobrepasado la temperatura de gelatinización, los gránulos de almidón pierden la estructura cristalina nativa y con ello la estructura de la cruz de malta (birrefringencia), lo que indica que el grado de organización cristalina de la amilopectina y la amilosa se ha perdido (Atwell, 1988).

Debido a los cambios morfológicos que se producen durante la gelatinización del almidón, éste adquiere una estructura más accesible a la degradación enzimática (Zelevnak and Hosenev, 1987; Slaughter *et al.*, 2001).

Cuando el almidón gelatinizado se deja en reposo por un tiempo y se enfría, las moléculas de amilosa tienen tiempo suficiente para alinearse de tal forma que pueden formar puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas adyacentes (Lineback y Rasper, 1988). Entonces, las disoluciones del almidón comenzarán a mostrar cambios en sus propiedades reológicas, como pérdida de viscosidad, y las pastas concentradas se tornan gomosas y exudan agua. Esos dos procesos se deben al fenómeno denominado retrogradación (Coultate, 1997). Cabe mencionar que el fenómeno de recristalización de la amilosa en el proceso de retrogradación dificulta la hidrólisis enzimática del almidón por las amilasas (Slaughter, 2001).

1.1.1 Amilosa

La amilosa es un polímero lineal constituido por unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4) con algunos enlaces α (1-6) presentes. La molécula de la amilosa no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal entre 6 a 8 unidades de glucosa por cada vuelta. Por esta razón, la amilosa y el yodo forman un complejo color azul, que es muy utilizado para cuantificar el contenido de amilosa en los almidones (Fig. 2). La intensidad del color azul del complejo amilosa-yodo refleja información sobre la longitud de la cadena de amilosa (Knutzon y Grove, 1994)

La amilosa tiene tamaño molecular variable y depende de la fuente botánica, la masa molar intermedia es aproximadamente de 1×10^5 hasta 1×10^6 Daltones y está conformada por alrededor de 500 a 6000 unidades de D-glucosa (MacAllister, 1979).

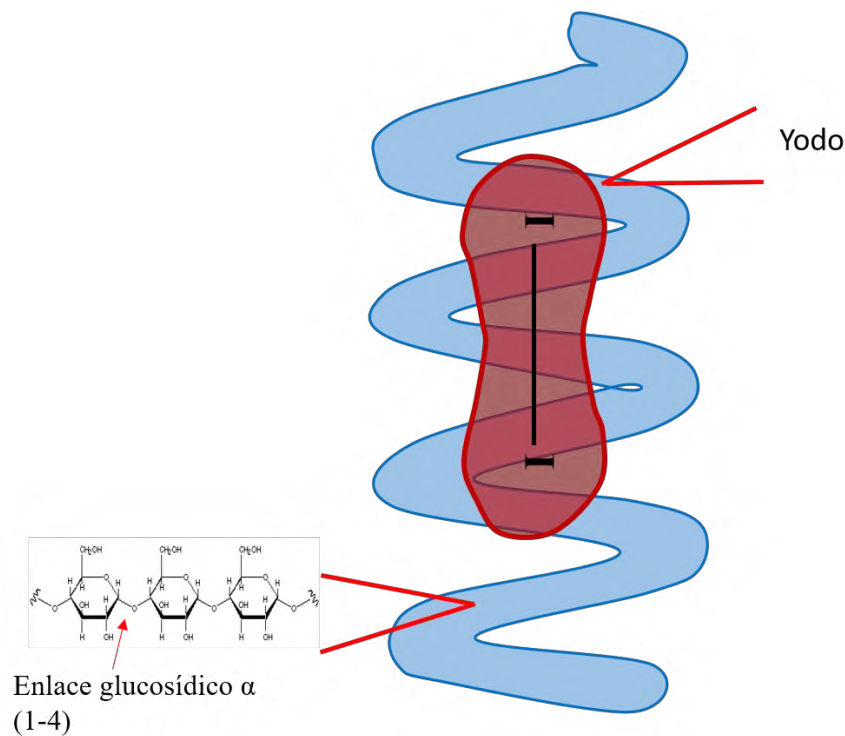


Figura 2. Estructura complejo amilosa-yodo.

1.1.2 Amilopectina

La amilopectina es el polímero mayoritario del almidón y está conformada por ramificaciones de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4) y en un 4-6% por enlaces α (1-6) en los puntos de ramificación. El peso molecular de la amilopectina es alto, con fracciones que llegan a alcanzar de 1×10^6 hasta 1×10^8 Daltones estas variaciones dependen de las fuentes botánicas del almidón aunque se han reportado pesos entre 300,000 y 500,000 Daltones (Bello Pérez *et al.*, 2002).

La estructura de la amilopectina que se muestra en la figura 3 se basa en los estudios realizados por Hizukuri, quien utilizó técnicas de cromatografía de permeación en gel y desramificación, para finalmente llegar a la estructura que conocemos en la actualidad (Streb y Zeeman, 2011).

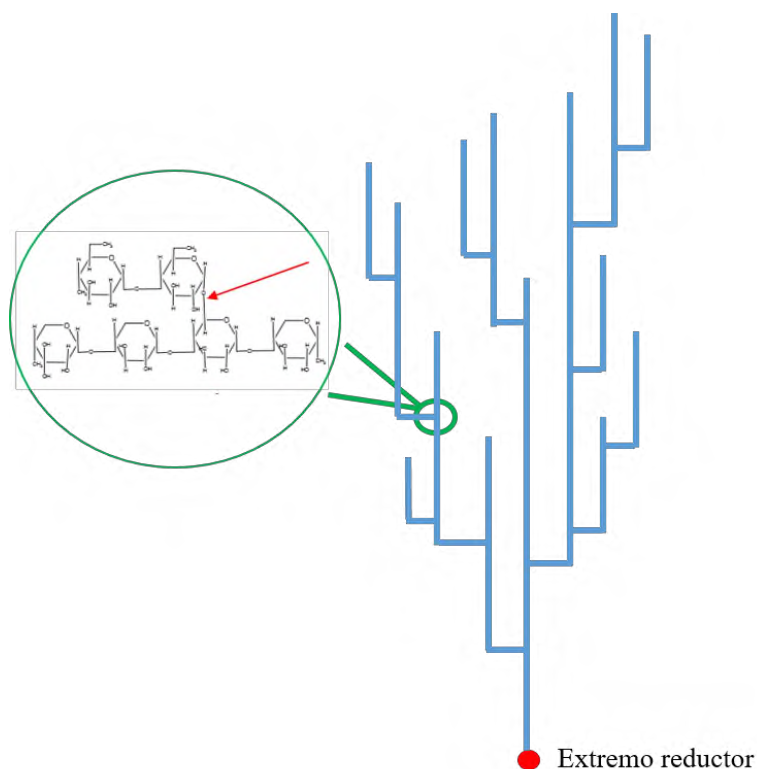


Figura 3. Estructura de la amilopectina.

Por otra parte, la morfología de los gránulos de almidón, la relación amilosa/amilpectina así como el mecanismo de degradación del gránulo de almidón depende de las fuentes botánicas de donde son extraídos, por ejemplo, Hernández-Medina *et al.*, 2008, al caracterizar diferentes almidones de tubérculos (camote, yuca, entre otros) observaron que los almidones de camote presentan forma esférica similares a los almidones de papa. Los almidones de yuca muestran una forma esférica-truncada (Fig. 4A1). Ospina *et al.*, 2002, mencionan que los gránulos más pequeños de almidón de papa tienen forma circular y los gránulos más grandes tienen forma elíptica, la superficie del gránulo es lisa (Fig 4A2). Tovar-Benítez *et al.* (2008), observó que los gránulos de almidón de maíz tienen una forma poliédrica (Fig. 4B1). Por otra parte (Sivolí *et al.*, 2009), observaron que los gránulos del almidón de yuca tienen forma redonda y oval-truncada (Fig. 4B2). Espinoza-Solís (2008), al analizar la estructura de los gránulos de almidón de mango y plátano, observó que los gránulos de almidón de mango presentaron forma esférica, forma de campana y que algunos gránulos estaban divididos. Por otra parte, los gránulos de almidón de plátano presentan forma ovoide alargada y son de mayor tamaño en comparación con los gránulos de almidón de mango (Fig. 4C y D). La velocidad de hidrólisis del almidón está inversamente relacionada con el tamaño de los gránulos, así la velocidad de hidrólisis es mayor para el trigo>maíz>yuca>papa (Ring *et al.*, 1988).

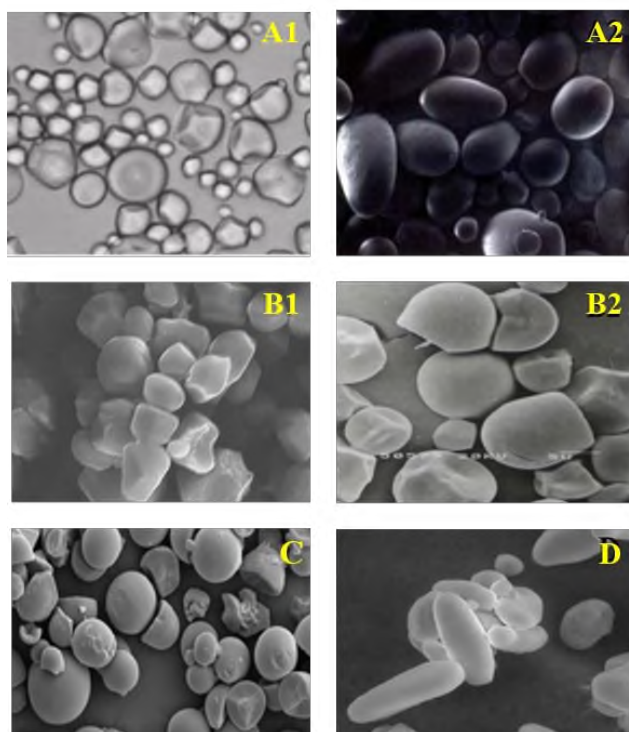


Figura 4. Morfología de los gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas A1). Camote. A2). Papa. B1). Maíz. B2). Yuca. C). Mango. D). Plátano. Imágenes tomadas de Ospina *et al.*, 2002; Tovar-Benítez *et al.*, 2008; Sivolí *et al.*, 2009; Espinoza-Solís, 2008.

1.1.3 Características del almidón comercial Eslab

El almidón comercial marca Eslab ha sido utilizado como sustrato para la caracterización bioquímica de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33). Presenta una relación de amilosa/amilopectina de 27.8 y 72.22%, respectivamente, y de acuerdo con el análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) contiene gránulos pequeños que son de forma circular y gránulos más grandes de forma elíptica, así mismo, la superficie de los gránulos es lisa (Fig. 5). Observando las morfologías de las diferentes fuentes botánicas del almidón en la literatura y comparándolo con el almidón comercial Eslab, se infiere que dicho almidón proviene de papa (Hernández-Heredia y del Moral S,

2016) ya que tiene similitud con la morfología de los gránulos de almidón analizados por Hurtado, 1997, Ospina *et al.*, 2002 y Bello-Pérez, 2008.

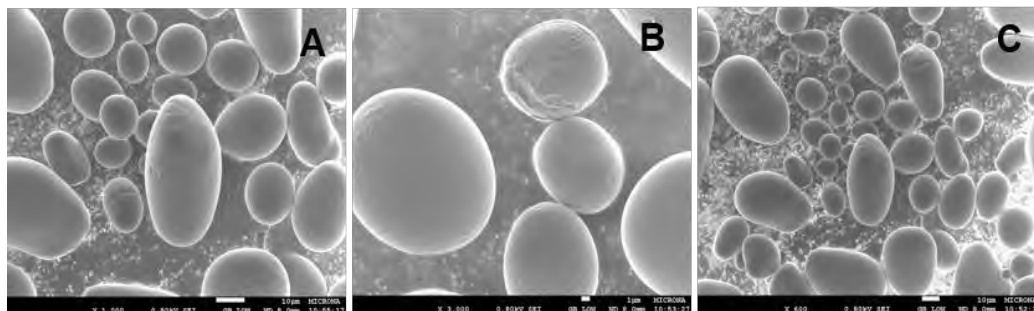


Figura 5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de los gránulos del almidón comercial Eslab, amplificados; A). 600X., B). 1000X., C). 3000X. Imágenes tomadas de Sarahí Hernández-Heredia y del Moral S, 2016.

1.2 Hidrólisis enzimática del almidón

A partir del siglo XVIII comenzó el desarrollo de la hidrólisis del almidón, debido a la falta de acceso de fuentes tradicionales de azúcar como consecuencia del bloqueo que ocasionó Napoleón en Europa. Con base en estos problemas se ofrecieron recompensas a aquellos que encontrarán métodos para obtener sustitutos (Fullbrook, 1984). El primero en encontrar algo similar fue el químico Kirchiff quien descubrió que hirviendo almidón en medio ácido y posteriormente neutralizándolo obtenía azúcar (Schwardt, 1990). Sin embargo, al no tener un método estandarizado se dio cuenta que la acción del ácido daba lugar a la formación de productos de sabor y color indeseables. Debido a las características indeseables obtenidas en los jarabes causados por la hidrólisis ácida, más tarde surgiría un nuevo método basado en el desarrollo de tecnología enzimática. En 1833, el francés Payen logró aislar la α -amilasa de la malta, a la cual llamó diastasa. Por otro lado, Takamine en 1894 utilizó un coctel enzimático (posiblemente el primer producto enzimático de origen microbiano) procedente de *Aspergillus oryzae* como suplemento alimenticio (Fullbrook, 1984). Al descubrir la importancia de las enzimas en la hidrólisis del almidón, este proceso permitió la producción de jarabes con características deseables. A mediados del siglo pasado, la industria del procesamiento del almidón cobró importancia, al utilizar una

amiloglucosidasa en conjunto con una α -amilasa para la producción de jarabes ricos glucosa (Luenser, 1983). Tiempo después se optimizó el proceso enzimático a nivel industrial cuando se utilizó la amilasa de *B. licheniformis*, una de las características importantes de esta enzima su estabilidad a altas temperaturas, lo cual permite una alta producción de jarabes con un contenido de glucosa alrededor del 98% (Long, 1986).

1.2.1 Enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α (1-4)

Las enzimas responsables de la hidrólisis del almidón son las glucosil hidrolasas (GH) dentro de las cuales se encuentran las α -amilasas (3.2.1.2), las β -amilasas (3.2.1.2), las amiloglucosidasas (3.2.1.3), las pululanastas (E.C. 3.2.1.41) y las ciclodextrinas glucanotransferasas (EC 2.4.1.19) (Fig. 6).

Las α -amilasas (3.2.1.1) (Fig. 6) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α (1-4) de la molécula del almidón. Estas enzimas son producidas por animales, vegetales y microorganismos, son generalmente estables a pH 5.5-8.0 en presencia de calcio (Vihinen *et al.*, 1989).

Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) (Fig. 6) son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos α (1-4) de los extremos no reductores de la amilosa, amilopectina o glicógeno, produciendo las formas β -anómicas de maltosa. La producción de las formas β -anómicas de maltosa se da por la inversión de la configuración α a β alrededor de la configuración del C1. Las β -amilasas están presente ampliamente en plantas y microorganismos tales como levaduras y bacterias (Reed, 1975; Henrissat, 1991; Georg-Kramer *et al.*, 2001).

La amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3) (Fig. 6) hidroliza los enlaces α (1-4) de los polisacáridos residuales que fueron expuestos a la acción de α y β amilasa. El principal producto de reacción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa. Las glucoamilasas son inactivas sobre almidón nativo. La temperatura y pH óptimo de estas enzimas oscila entre 4-5.5 y 55-65°C, respectivamente (Alan Wiseman, 1985).

Las ciclodextrinas glucanotransferasas (EC 2.4.1.19) (Fig. 6) son enzimas capaces de degradar el almidón convirtiéndolo principalmente en ciclodextrinas (CDs), además de la ciclación estas enzimas catalizan otras tres reacciones: acoplamiento, transferencia e

hidrólisis. En la actualidad las ciclodextrinas glucanotransferasas son estudiadas por su potencial uso biotecnológico, ya que debido a su estructura pueden formar complejos de inclusión con gran variedad de moléculas, debido a esta propiedad las CDs son utilizadas en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria, así como en procesos de bioconversión y separación (Tonkova, *et al.*, 1998).

Las pululanasa (E.C. 3.2.1.41) (Fig. 6) también conocida como pulalan-6-glucanohidrolasa, hidroliza los enlaces glucosídicos α (1-6) en la molécula del pululano (polisacárido formado por unidades de maltotriosa) del almidón y tiene como productos principales la maltotriosa y maltosa e hidroliza el almidón para dar como producto principal maltosa (Adinarayana *et al.*, 2006).

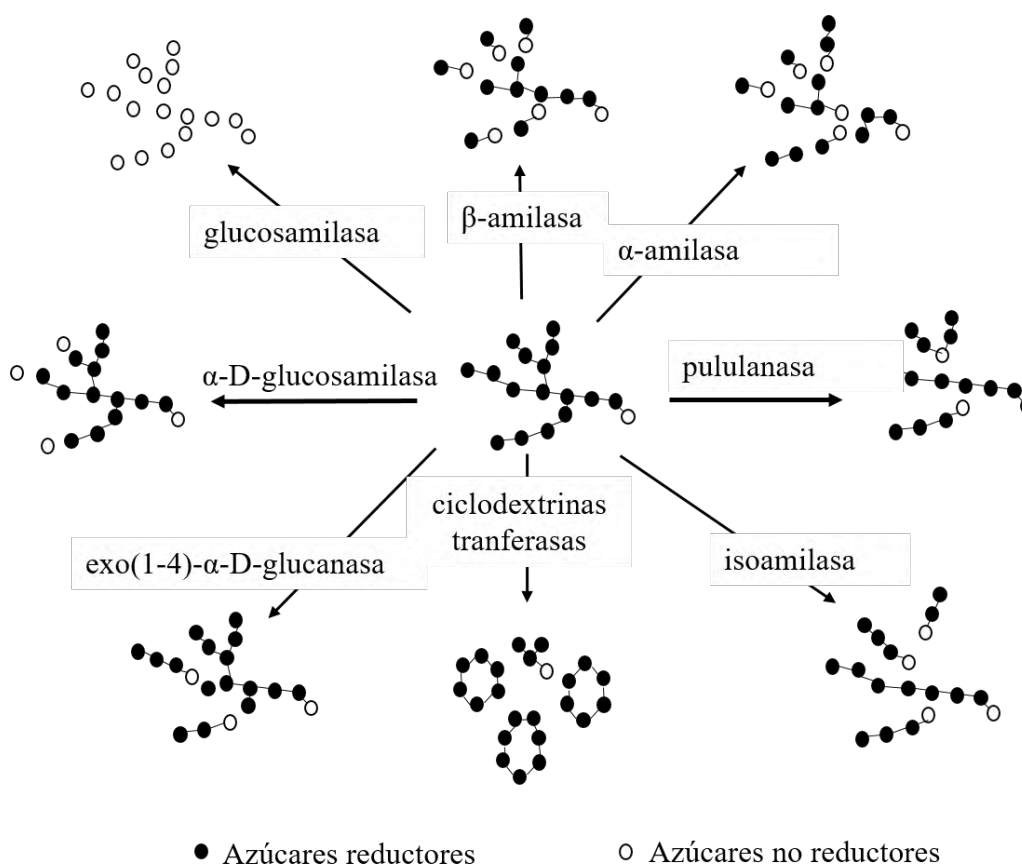


Figura 6. Sitio de hidrólisis de diferentes α -amilasas sobre la molécula de almidón.
Imagen tomada de Kennedy *et al.*, 1988.

1.2.1.1 Fuentes productoras de α -amilasas

Las α -amilasas se pueden sintetizar por diversos organismos incluyendo plantas, animales, hongos y bacterias (Da Lagea *et al.*, 2007). Las enzimas de fuentes microbianas son generalmente utilizadas para procesos industriales ya que tienen una serie de ventajas como buena productividad, alta termoestabilidad, bajo costo de producción, manipulación segura, y facilidad de modificación de procesos. Las α -amilasas producidas por *B. subtilis* sp. *B. amyloliquefaciens*, *Escherichia* spp. *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurosporas*, *Penicillium*, *Falcifarum* *Rizhopus*, *Mucor* y *Candida* son las más comercializadas debido a sus características bioquímicas y cinéticas (Gupta *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Aplicaciones de las α -amilasas

Debido a su acción, las α -amilasas tienen una amplia aplicación en la industria alimentaria, de fermentación, textil, cervecera y papelera, para fabricar diversos productos o mejorar las características organolépticas de los productos (Pandey *et al.*, 2010).

La principal aplicación de las α -amilasas en la industria es la fabricación de cerveza, en el proceso de maceración, ya que la levadura fermentativa no es capaz de metabolizar sustratos complejos como el almidón (Chica, 1996).

Otro proceso industrial en donde se utilizan α -amilasas es en la obtención de jarabes fructosados a partir del almidón. Durante este proceso se utilizan tres tipos de hidrolasas: glucoamilasa, α -amilasas y glucosa isomerasa. La α -amilasa hidroliza los enlaces glicosídicos α (1-4) de la molécula del almidón y genera azúcares sencillos como: glucosa, maltosa y maltodextrinas, mientras que la glucoamilasa hidroliza los residuos que ha dejado la α -amilasa, finalmente la glucosa isomerasa convierte a la glucosa en su esteroisómero, fructosa (Hernández-Uribe *et al.*, 2008).

En la industria de detergentes también las α -amilasas son utilizadas como ingredientes para degradar las manchas ocasionadas por los residuos de almidón, estas α -amilasas deben tener ciertas características: ser resistentes a proteasas, temperatura óptima entre 70-90°C y pH óptimos alcalinos. Una de las α -amilasas que es muy utilizada en los jabones es la que proviene de *B. licheniformis* (Kir *et al.*, 2002).

En la industria de panificación también son ampliamente utilizadas las α -amilasas, ya que se pueden añadir a la masa de pan para degradar el almidón de la harina y obtener principalmente productos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa, entre otras, estos productos son posteriormente fermentados por la levadura. La adición de la enzima a la masa da como resultados una mejora en la tasa de fermentación y la reducción de la viscosidad de esta misma. Por otra parte, produce azúcar en la masa, lo que mejora el sabor, el color de la corteza y el tostado, y la suavidad de los productos horneados (van der Maarel, *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003).

En la industria textil, las α -amilasas son utilizadas principalmente para el proceso de desengomado, para ello se utilizan α -amilasas bacterianas provenientes de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, que son estables a altas temperaturas (Hendriksen *et al.*, 1999).

En cuanto al posicionamiento económico de las enzimas, la venta mundial se ha incrementado de manera constante y estudios de mercado concluyen que se seguirá incrementado en los próximos años (Global Food Enzymes Market 2014-2017 and 2025). Tan sólo en el año 2015, Market research Report registró que el mercado global de enzimas utilizadas principalmente en el sector de alimentación y panificación fue de 255.1 millones de dólares, de los cuales 82.7 millones de dólares corresponden a los ingresos del mercado europeo. Norteamérica fue el mercado más grande con una producción de 27,799.7 toneladas de α -amilasas (<https://www.grandviewresearch.com>).

1.2.1.3 Propiedades estructurales de las α -amilasas

El peso molecular de las α -amilasas bacterianas del género de *Bacillus* oscila entre 22-76 kDa (Pandey *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003; Hernández-Heredia y del Moral S, 2016) y como consecuencia también varía su estructura primaria y la composición de las regiones que las conforman. Las α -amilasas por lo menos están constituidas por un dominio A/B, donde se encuentra el sitio activo y un dominio C que en algunos casos está relacionado con la termoestabilidad de la enzima. Las α -amilasas de peso molecular bajo 20-30 kDa (Saito, 1973) no tienen péptido señal ni la región C-terminal y las de mayor peso molecular 40-70 kDa contienen dominios adicionales que algunas veces pueden estar involucrados con la unión a carbohidratos (Fig. 7).

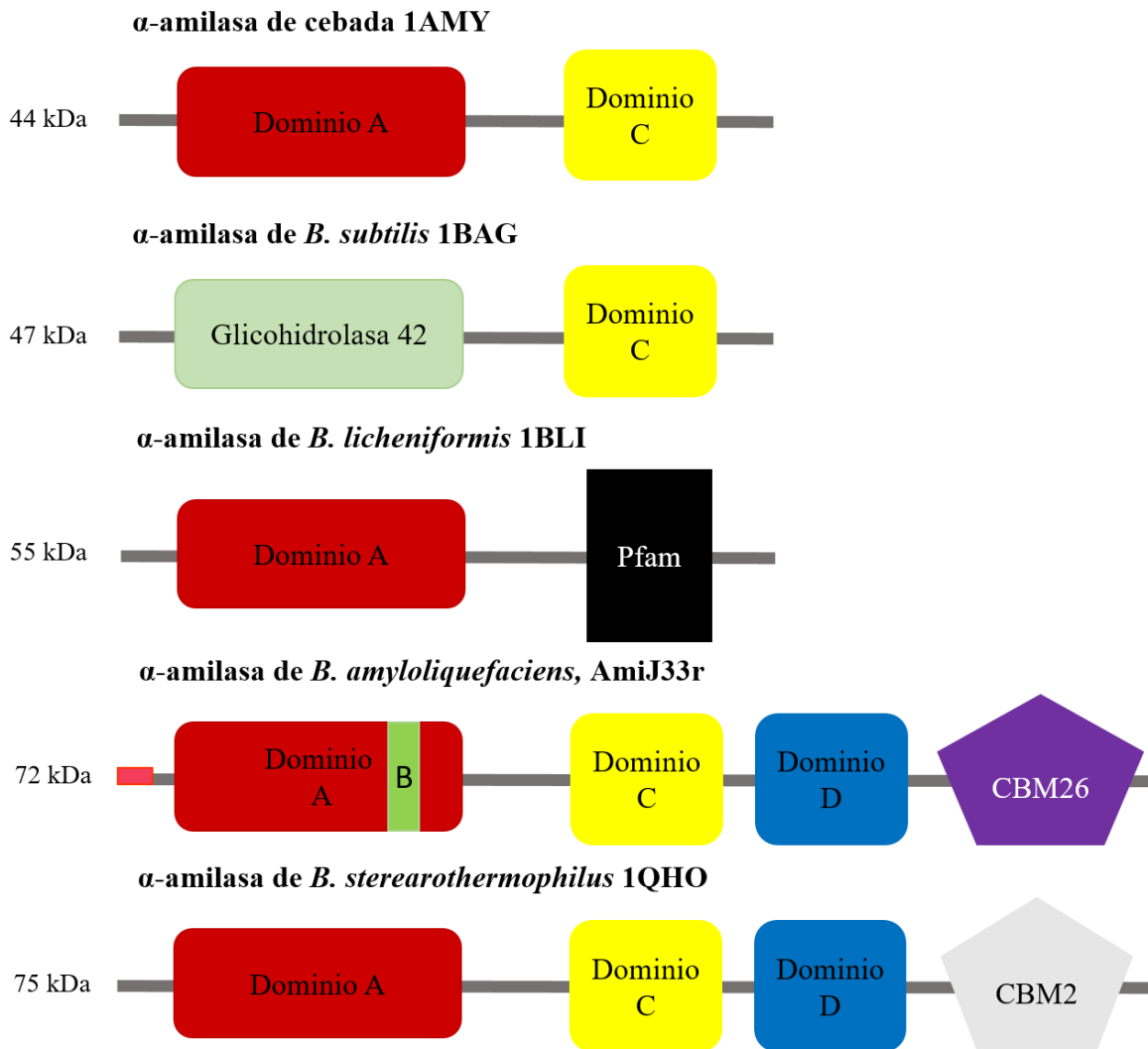


Figura 7. Estructura primaria y diferencia de peso molecular de diversas α -amilasas.

1.2.1.4 Características más importantes de cada una de las regiones y dominios de las α -amilasas

Péptido señal: la mayoría de las α -amilasas bacterianas están constituidas por un péptido señal, este péptido contiene entre 26-28 aa, consta de una región cargada positivamente, una región hidrofóbica, y una región polar que contiene un sitio de escisión específico (Rabhi *et al.*, 2007) (Fig. 7). La vía de secreción de proteínas SEC-SRP está implicada en este proceso (Fig. 8), en donde una vez que se lleva a cabo la transcripción y la

traducción, la selección de la ruta SEC o SRP se realiza en la etapa de las cadenas nacientes que emergen del ribosoma (Beck *et al.*, 2000), es decir, si los segmentos señal de las proteínas son muy hidrofóbicos como es el caso del péptido señal, recae en la vía SRP de lo contrario si la secuencia señal de las proteínas es menos hidrofóbica o corta recae en la vía SEC. Sin embargo, ambas vías pueden trabajar de forma complementaria. Después del reconocimiento de la secuencia señal, la proteína es transportada por SEC B hacia SEC A donde SEC A se encarga de transportar a la proteína hacia la membrana. El péptido señal es removido por una peptidasa tipo I después de pasar la membrana citoplasmática, posteriormente se libera la proteína madura al medio extracelular y finalmente las proteínas se pliegan en su conformación nativa (Salimi *et al.*, 2008; Harwood *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2007).

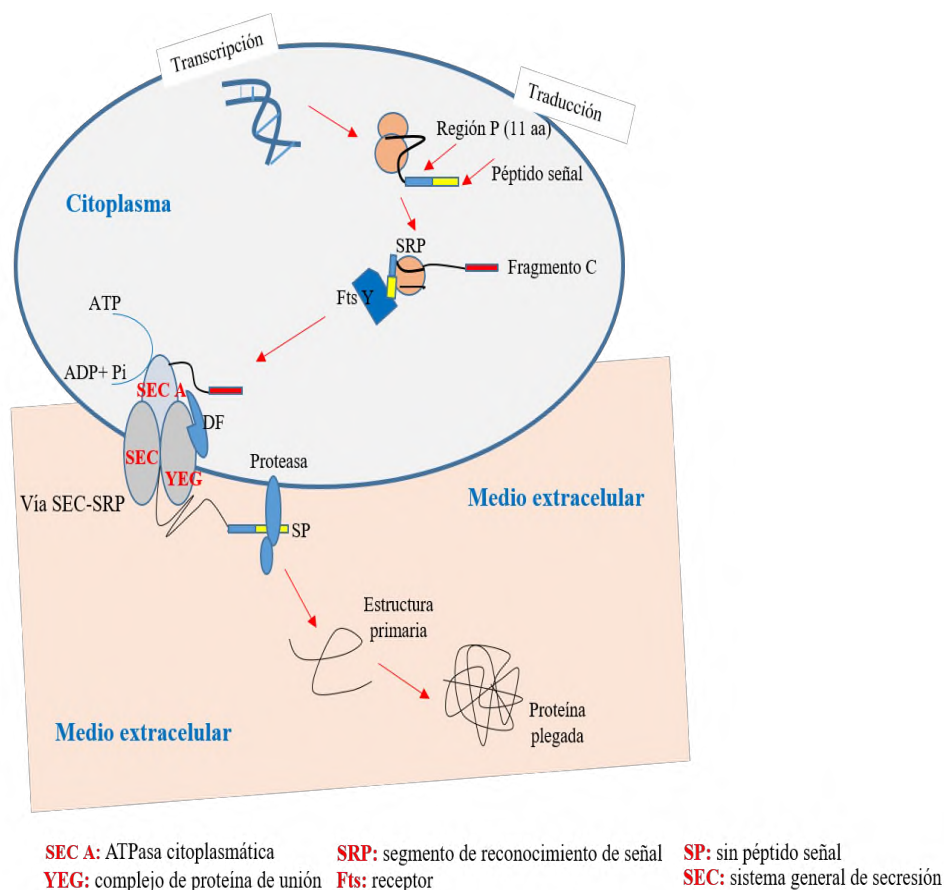


Figura 8. Propuesta de la vía de secreción de la α -amilasa de *Bacillus*, Salimi *et al.*, 2012.

Dominio A/B: El dominio A es el más conservado en las α -amilasa microbianas, se caracteriza por tener una estructura denominada TIM-barrel conformada por ocho α -hélices y ocho β -láminas (Nielsen *et al.*, 2000) (Figs. 9 y 10). En la estructura TIM-barrel se localiza la triada catalítica responsables de la actividad amilolítica: dos residuos de ácido aspártico (Asp) y un residuo de ácido glutámico (Glu) (Prasanna, 2005). Dentro del dominio A se encuentra el dominio B, este dominio está conformado por un largo bucle que sobresale entre la lámina β_3 y la α -helice₃, es altamente variable en longitud (50-100 aa) y se conforma por β -láminas, su función está relacionada con la estabilidad de la enzima, y está involucrado junto con el dominio A en la interacción con iones (Na y/o Ca).

Dominio C: El dominio C forma parte de la última secuencia en donde se localiza el extremo C-terminal y éste se encuentra unido al dominio A (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). En trabajos reportados por Mehta and Satyanarayana, 2014 y Liu *et al.*, 2017 se menciona que el dominio C en algunas α -amilasas está involucrado en la termoestabilidad de la enzima, incluso Hua *et al.*, 2004 resaltan que existe una mayor termoestabilidad cuando el dominio C se fusiona con el dominio de unión a almidón (SBD) (Fig. 9).

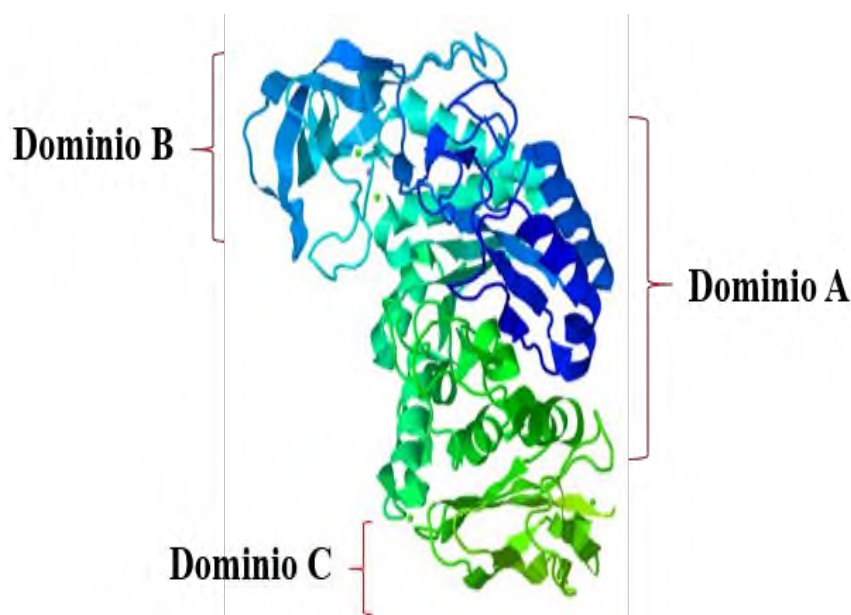


Figura 9. Estructura 3D de la α -amilasa, *B. amyloliquefaciens* P00692 (PDB: 3BH4), imagen propia, modelada en PyMOL. El dominio A esta representado de color azul, el dominio B se representa de color cian y el dominio C por el color verde.

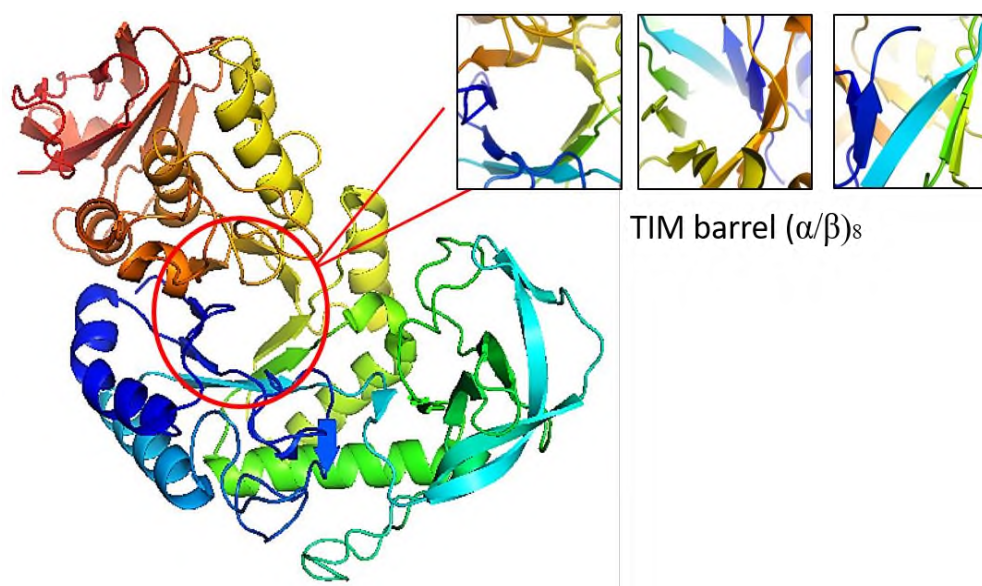


Figura 10. Estructura 3D de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* P00692, estructura TIM barrel (PBD: 3BH4), imagen propia, modelada en PyMol. En la parte superior derecha se muestran tres figuras que representan al TIM-barrel en diferentes ángulos.

Dominios de unión a almidón (starch binding domains, SBDs): Las enzimas hidrolíticas microbianas que catalizan la degradación de gránulos de almidón o paredes celulares de plantas, poseen en su estructura dominios auxiliares no catalíticos denominados módulos de unión a carbohidratos (Carbohydrate Binding Module, CBM). Los CBM pueden tener afinidad por el almidón, celulosa o xilano y aquellos con afinidad a almidón se conocen comúnmente como dominios de unión a almidón (SBD) (Christiansen *et al.*, 2009) y se agrupan en diez familias de CBM: 20, 21, 25, 26, 34, 41, 48, 58, 69 y 74 (<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Module>).

El SBD está presente en enzimas provenientes de bacterias, arqueas y eucariotas, se ha identificado en aproximadamente el 10% de las enzimas amilolíticas (Janecek y Sevcik, 1999). Estructuralmente, se pueden encontrar con mayor frecuencia en la región C-terminal (Janecek *et al.*, 2002) y rara vez en la región N-terminal (Fig. 11), incluso algunas α -amilasas pueden tener en tándem más de un módulo de unión. El SBD está conformado por un segmento de aproximadamente 100 aminoácidos conservados (Juge *et al.*, 2002). Sus

residuos consenso son, aminoácidos aromáticos como Trp, Tyr y Phe, que pueden ser los responsables de la unión de los diversos hidratos de carbono (Van y Boraston 2007; Tung *et al.*, 2008; Guillen *et al.*, 2009; Koropatkin y Smith 2010). La función principal del SBD es ayudar al dominio catalítico a unirse al almidón nativo (insoluble) y degradarlo (Southall *et al.*, 1999) incrementado su actividad, sin embargo, en algunas α -amilasas ha tenido el efecto contrario, es decir, tal parece que la presencia del SBD en algunas α -amilasas afecta negativamente la actividad enzimática (Tabla 2).

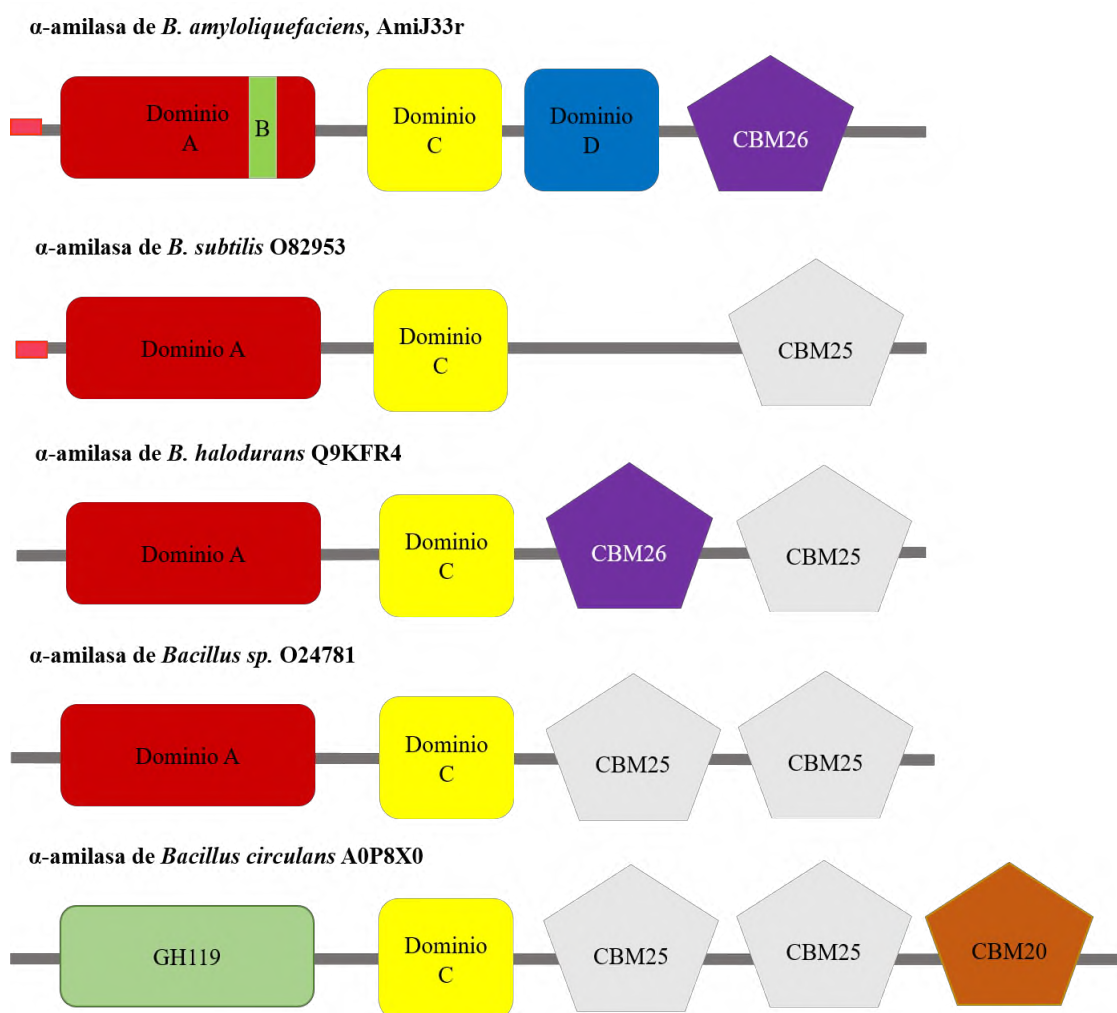


Figura 11. Representación de familias de CBM que contienen SBD (UniProt y SMART).

Tabla 2. Efecto del SBD en la actividad enzimática de algunas α -amilasas

Enzima	Regiones	Actividad en almidón soluble	Actividad en almidón insoluble	Referencia
α -amilasa (AmiJ33)	AmiJ33r (gen completo)	280 U/mg	0 U/mg	Montor-Antonio <i>et al.</i> , 2017
	AmiJ33 (Δ SBD)	5198 U/mg	44.24 U/mg	
α -amilasa (AmyP)	WT	453.5 $\pm$ 10.7 U/mg	119.2 $\pm$ 1.6 U/mg	Hui Peng, <i>et al.</i> , 2014
	Δ SBD	103.2 $\pm$ 4.8 U/mg	55.5 $\pm$ 1.4 U/mg	
α -amilasa (SusG)	WT	100 $\pm$ 12.7%	100 $\pm$ 5.7%	Koropatkin and Smith, 2010
	Δ SBD	162 $\pm$ 5.9%	29 $\pm$ 1.4%	
α -amilasa	WT	200.3 U/mg	11 U/mg	Lo Huei Fen <i>et al.</i> , 2002
	Δ SBD	207.1 U/mg	11 U/mg	

1.2.1.5 Mecanismo de reacción de las α -amilasas

Las α -amilasas se caracterizan por hidrolizar los enlaces glucosídicos α (1-4) de la molécula del almidón para generar productos como glucosa y maltosa, entre otros. El mecanismo catalítico es similar al de las glucosil hidrolasas que llevan a cabo la hidrólisis del enlace glucosídico mediada por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el sitio activo; uno actúa como donador de protones y otro como nucleófilo o base (Fig. 12).

El enlace glucosídico puede hidrolizarse de dos formas, dependiendo de la configuración del carbono anomérico que haya resultado de la hidrólisis. La primera configuración consiste cuando el carbono anomérico cambia y se conoce como inversión de la configuración. Por otro lado, si la configuración del carbono anomérico se mantiene, se dice que la reacción es por retención de la configuración.

El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, por lo general estas reacciones ocurren en las β -amilasas y glucoamilasas. Uno de los dos residuos que interaccionan en este proceso es el ácido glutámico (Glu) del sitio catalítico que opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno (Fig. 12A).

El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento, por lo general esta reacción ocurre en la mayoría de las α -amilasas. En este proceso uno de los residuos de ácido aspártico (Asp) realiza un ataque nucleófilico al carbono anomérico. Como resultado tiene lugar la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glicósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glicosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua que rompe el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Davies y Henrissat, 1995; Ly y Withers, 1999; Withers, 2000) (Fig. 12B).

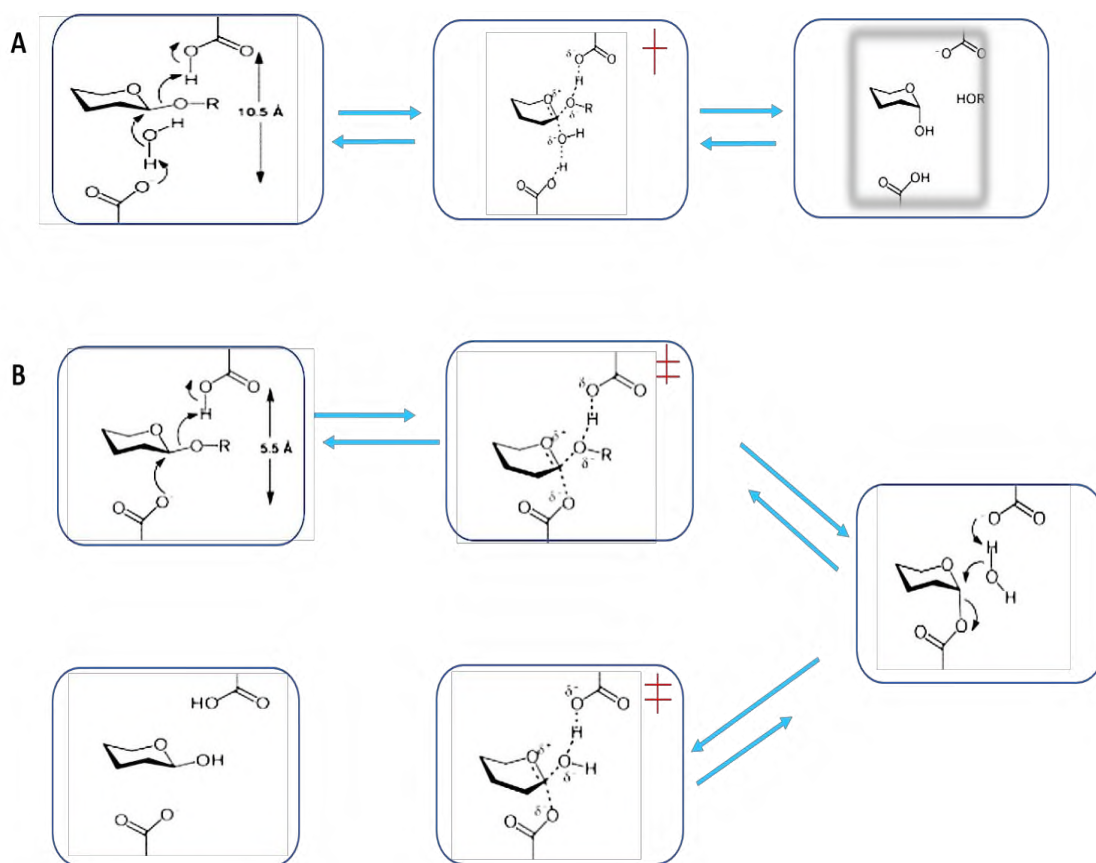


Figura 12. Mecanismo de reacción de las glucosil hidrolasas. A. Mecanismo de inversión. B. Mecanismo de retención.

1.3 AmiJ33, α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

Bacillus amyloliquefaciens JJC33M se aisló de suelos cultivados con caña de azúcar en la cuenca del Papaloapan. Es una bacteria Gram positiva, fermenta glucosa, manitol y produce una α -amilasa denominada AmiJ33 de 50 kDa (Montor *et al.*, 2014). Cuando AmiJ33 nativa se caracterizó bioquímica y cinéticamente se concluyó que el pH óptimo de AmiJ33 es 5.0, la temperatura óptima de actividad es a 80°C, la vida media de AmiJ33 a 40, 50 y 60°C son de 16.5 h, 2.31 h y 15 min, respectivamente. Los resultados para K_m y V_{max} son 10.6 mg/mL y 41 U/mg, respectivamente. En cuanto a los productos de hidrólisis, AmiJ33 genera glucosa, maltosa y maltopentosa a partir de almidón nativo, además sólo hidroliza el 25% del almidón (Eslab), lo cual correlaciona con el porcentaje de amilosa 27.8% del polisacárido (Hernández-Heredia y Del Moral S, 2016).

Por otro lado, el análisis de la secuencia del genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M indicó que dicho microorganismo codifica un gen para una α -amilasa (*amyJ33S*) de 72 kDa, 22 kDa más que la α -amilasa que se expresa (Montor-Antonio *et al.*, 2017). Lo anterior indica que la proteína de 72 kDa se procesa, tanto en el extremo N como en el C-terminal, antes de ser exportada al medio extracelular con un peso de 50 kDa, tamaño suficiente para abarcar a los dominios A/B y C. El análisis de la secuencia genómica de la α -amilasa recombinante, AmiJ33r, reveló que la enzima tiene una identidad entre el 95-99% con α -amilasas del género *Bacillus* y está conformada por un péptido señal, una región-P, un dominio A/B (317aa), un dominio C (76aa) y además contiene una región extra C-terminal que incluye una región de transición y un SBD putativo (176aa) (Fig. 13). Como se ha señalado, la región C-terminal no se encuentra presente en todas las α -amilasas. Al comparar las propiedades bioquímicas y enzimáticas de la α -amilasa AmiJ33 nativa y recombinante (expresada en *B. amyloliquefaciens* JJC33M y *E. coli* TOP10) se infirió que la región C-terminal tuvo un efecto positivo en la termoestabilidad (50 contra 60°C) y en la estabilidad a pHs alcalinos (20%). Sin embargo, tuvo efecto negativo en la eficiencia catalítica y en la actividad enzimática en almidón soluble, sobretudo la región C-terminal evitó la degradación del almidón nativo (Montor-Antonio *et al.*, 2017). Lo anterior resultó sorprendente, ya que en la región extra del C-terminal se localizó una región putativa de unión a almidón (SBD), que en teoría, debe mejorar la capacidad hidrolítica en almidón nativo. Dadas las particularidades

estructurales de AmiJ33r y su incapacidad de hidrolizar almidón nativo, resulta interesante estudiar el efecto del dominio C y la región C-terminal en el procesamiento del almidón en un mismo sistema de expresión.

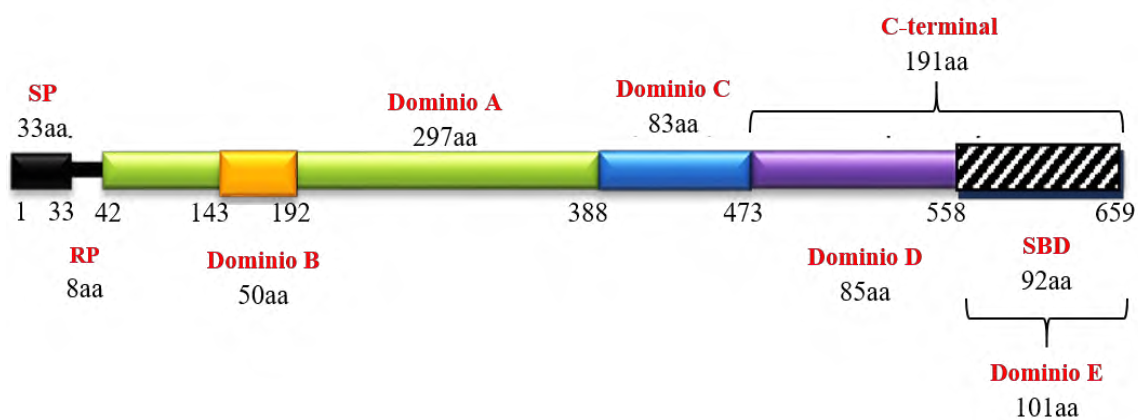


Figura 13. Representación de la estructura primaria de AmiJ33r (Montor-Antonio *et al.*, 2017).

II. JUSTIFICACIÓN

Dada la demanda de α -amilasas, tan solo en el año 2015, sus ventas en el mercado global principalmente en el sector de alimentación y panificación fueron de 255.1 millones de dólares. Esto se debe principalmente a que las empresas buscan enzimas competitivas que les permitan optimizar tiempo, materia prima, reactivos y costos. Por lo tanto, ante estas situaciones se buscan desarrollos biotecnológicos para comprender el funcionamiento de las enzimas y construir nuevas con características y condiciones óptimas que permitan seguir aumentando la productividad enzimática de gran importancia económica.

AmiJ33 (contiene dominio A/B y C) es una α -amilasa que debido a sus características enzimáticas y bioquímicas puede ser incorporada en el sector de panificación. Por otro lado, AmiJ33r (contiene dominio A/B, C, D y E (SBD)) podría ser incorporada en el sector de panificación o industria textil debido a sus características bioquímicas. Sin embargo, se necesita realizar un estudio detallado sobre la función de sus dominios.

El dominio C en las α -amilasas puede tener efecto en la actividad de la enzima, la región C-terminal en las α -amilasas puede generar cambios en la especificidad del sustrato y en la actividad enzimática. Estudios comparativos entre AmiJ33 y AmiJ33r han mostrado que la región C-terminal está relacionada en ambas características, por lo tanto, es deseable estudiar la función del dominio C y la región C-terminal (dominio D y SBD) en AmiJ33r y analizar la función del SBD presente en la misma región, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la función de las regiones extras de esta enzima en términos bioquímicos y enzimáticos.

III. HIPÓTESIS

La eliminación del dominio C y de la región C-terminal (dominio D y SBD) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M disminuirá la eficiencia catalítica, la actividad enzimática y la termoestabilidad de la enzima y cambiará su especificidad por el sustrato.

El dominio tipo SBD presente en la región C-terminal de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* es capaz de unirse a moléculas de almidón.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la función del dominio C y de la región C-terminal (dominio D y SBD) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M a través de la caracterización bioquímica y cinética de las versiones truncadas.

4.2 Objetivos particulares

- Estudiar mediante modelado *in silico* las regiones estructurales de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r, AmiJ33-AB, AmiJ33-ABC, AmiJ33-ABCD y el SBD).
- Construir y purificar versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33-AB, AmiJ33-ABC, AmiJ33-ABCD y el SBD).
- Estudiar el efecto de la región C-terminal en la termoestabilidad, vida media, efecto de pH y especificidad por el sustrato.
- Determinar la funcionalidad (capacidad de unirse a moléculas de almidón) del dominio tipo SBD.

V. METODOLOGÍA

5.1 Modelado de la estructura tridimensional de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, AmiJ33r

La secuencia aminoacídica de AmiJ33r sin el péptido señal fue modelada en 3D con los siguientes servidores; I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>), SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) y Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>). El mejor modelo fue seleccionado con base en PROCHECK-Z Score, con base en el porcentaje de identidad (secuencias de α -amilasas homologas) y con base en el diagrama RMSD Ramachandran. Una vez seleccionado el mejor modelo 3D, éste se utilizó como molde para modelar las versiones truncadas de AmiJ33r (AmiJ33-AB, AmiJ33-ABC, AmiJ33-ABCD y el SBD). PyMOL fue el software que se utilizó para predecir las estructuras 3D de las versiones truncadas.

5.2 Material biológico

B. amyloliquefaciens JJC33M se obtuvo de una colección de cepas del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan (Montor *et al.*, 2014).

E. coli TOP10 y *E. coli* BL21 fueron utilizadas para realizar las clonaciones. Los genotipos respectivos de estas cepas se enlistan en la tabla 3:

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* y genotipos

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK16 rpsL (Str ^R) endA1 λ^- .	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr].	Invitrogen

5.3 Condiciones y medio de cultivo

B. amyloliquefaciens JJC33M se creció a 37°C, 180 rpm, por 24 h, en medio el YENB (Tabla 4).

Tabla 4. Medio YENB

Componente	Concentración (g/L)	Marca y N° catálogo
Extracto de levadura	7.5	BD Bacto, Cat 212750
Caldo nutritivo	8.0	BD Bioxon, Cat 210300

Las cepas de *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 se crecieron a 37°C, 180 rpm, por 16 h, en medio LB (Tabla 5). Al medio de cultivo se le adicionó 100 µg/mL de ampicilina para mantener los plásmidos. Se agregó 1.4% de agar al medio para la preparación de las cajas Petri. Las cepas se almacenaron a -20°C en glicerol al 40% (v/v) diluyendo en proporción 1:1 cultivo: glicerol al 80% (v/v) respectivamente y se utilizaron como inóculos para las fermentaciones.

Tabla 5. Medio LB

Componente	Concentración (g/L)	Marca y N° catalogo
Extracto de levadura	5	BD Bacto, Cat 212750
Triptona	10	BD Bacto, Cat 211705
NaCl	10	J.T B aker, Cat 3524-01

5.4 Extracción y purificación del ADN genómico de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

Las células de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se crecieron en medio YENB estéril. Posteriormente se inoculó 10% (v/v) del medio descrito anteriormente en un medio de cultivo volumen final, se incubó a 37°C, 24 h, 180 rpm (Excella E24 Incubator, New Brunswick

Scientific). Se centrifugó 1.8 mL de medio fermentado a 10 000 g por 1 min, se eliminó el sobrenadante y se recuperaron las células (Heraeus Pico 17 Centrifuge, Thermo Scientific). El ADN genómico se obtuvo con el kit UltraClean Microbial DNA Isolation MO BIO), siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.5 Amplificación de las versiones truncadas de AmiJ33

Las versiones truncadas del gen *AmyJ33s* se amplificaron por PCR usando en las reacciones las concentraciones mencionadas en la tabla 7 con los oligonucleótidos: AmiJASPFw y AmiJDBRv para AmiJ33-AB, para AmiJ33-ABC con AmiJASPFw y AmiJABCRv, para AmiJ33-ABCD con AmiJASPFw y AmiJABCDRv y para el SBD con AmiJSBDFw y AmiJSBDRv. Los oligonucleótidos mencionados se enlistan en la tabla 6. Las condiciones de amplificación usadas se muestran en la tabla 8.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de las versiones truncadas

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Longitud (b)	Tm °C
AmiJASPFw	5' <u>CACCCATATG</u> GGTGACCGCATCTTCAGTCAAA 3'	31	63
AmiJDBRv	5' <u>CTCGAG</u> ACCGCCCATTACATTGTGAAA 3'	27	60
AmiJABCRv	5' <u>CTCGAG</u> CGCATTTCCGATATCGTCAGG 3'	27	63
AmiJABCDRv	5' <u>CTCGAG</u> TTTGACAAACGTGTATTCTTGGGT 3'	30	60
AmiJSBDFv	5' <u>CACCCATATG</u> AAAGACCCGTCTCAAGCCAAC 3'	21	63
AmiJSBDRv	5' <u>CTCGAG</u> ATG CCG AAG ATA GCC ATT CAA 3'	24	60

CATATG Nde1

CTCGAG XhoI

CACC Bases necesarias para la clonación unidireccional

Los nucleótidos subrayados son los adicionados para el reconocimiento de enzimas NdeI, XhoI y las bases necesarias para la clonación unidireccional en pET101D/TOPO.

Tabla 7. Componentes de PCR

Componentes	Volumen (μ L)
Agua	16.2
10x Taq Buffer	2
dNTP Mix 10mM	0.4
MgSO ₂ 50 mM	0.4
Oligonucleótido Forward 10 μ M	0.2
Oligonucleótido Reverse 10 μ M	0.2
ADN (46 ng/ μ L)	0.4
Vent DNA polimerasa 1U/ μ L (Invitrogen)	0.2

Tabla 8. Condiciones de PCR

N° de ciclos	Etapas	Tiempo (min)	T (°C)
1	Desnaturalización	1	95
	Desnaturalización	0.5	95
30	Alineamiento	0.5	*
	Extensión	1 min por kb	72
1	Extensión final	5	72

*Según sea el par de oligonucleótidos: AmiJASPFw y AmiJ33 ABRv; SBDFw y SBDRv a 58.4, AmiJASPFw y AmiJ33 ABCRv a 60°C y AmiJASPFw con AmiJ33 ABCDRv a 59°C.

5.6 Electroforesis de ADN

El material genético se verificó por electroforesis de agarosa. Se cargaron 3 μ L de ADN mezclado con 3 μ L de SBX 6X (Sacarosa, azul de Bromofenol, azul de Xileno) en un gel de agarosa 0.8% (p/v). Se utilizó como amortiguador de corrida TAE 1X (Tabla 9). Las muestras fueron corridas a voltaje constante de 100 V, de 30 a 40 min (Mini Sub® Cell GT BIO-RAD). Al término de la electroforesis, el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) por 5-10 min, posteriormente se realizaron lavados con agua destilada por 10 min, y finalmente el gel fue observado en un fotodocumentador (Syngene Ingenius LHR) mediante el programa GeneSnap.

Tabla 9. Componente del TAE 1X

Componente	Concentración (g/L)	Marca y N° catálogo
Tris base	48.4	Bioland Scientific, Cat CT01-5KG
Ácido acético glacial	11.42 mL	J.T Baker, Cat 9508-05
Agua destilada	100 mL	-----
EDTA 0.5 M	20 mL	J.T Baker, Cat 8993-01

5.7 Clonación de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JC33M

Para realizar las clonaciones de las versiones truncadas de AmiJ33, se utilizaron dos tipos de plásmidos; uno de clonación, pJET1.2/blunt y dos de expresión; el pET22b(+) y el pET101/D-TOPO (Invitrogen, K101-01) (Fig. 17). El pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, K1232) (Fig. 15) es un vector de clonación y se caracteriza por la fácil recuperación de los productos de PCR mediante digestión con enzimas de restricción. Los plásmidos pET22b (+) y pET101/D-TOPO son vectores de expresión, los cuales se caracterizan por que tienen un sistema de expresión fuerte inducible por IPTG y un parche His-Taq que permiten la purificación de proteínas recombinantes, ambos plásmidos contienen un gen de resistencia a ampicilina que permite la selección de clonas positivas. En la figura 14A y 14B, se resume la estrategia de clonación de las versiones truncadas de AmiJ33 en los plásmidos pJET1.2/blunt pET22b(+) y pET101/D-TOPO, respectivamente. Se utilizaron ambos plásmidos debido a la llegada tardía del plásmido pET101D/TOPO al laboratorio. Una de las principales ventajas del pET101D/TOPO con respecto al pET22b es que tiene integrada la enzima topoisomerasa y optimiza el tiempo de ligación y clonación.

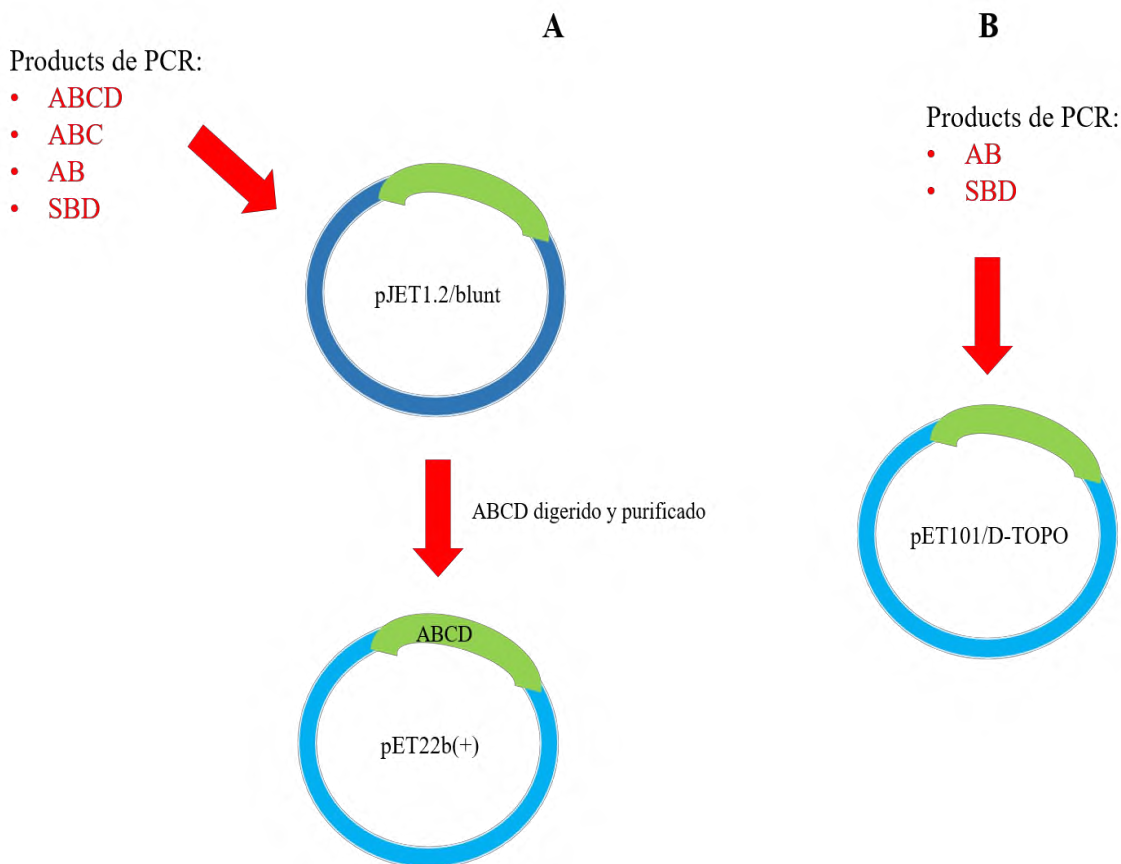


Figura 14. Estrategia de clonación de las versiones truncadas.

5.7.1 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido pJET1.2/blunt

El producto de PCR de cada versión truncada del gen *AmyJ33s* fue clonado en el plásmido pJET 1.2/blunt (Fig. 15) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se usaron 0.5 μ L de producto de PCR (100 ng/ μ L) y 0.5 μ L de vector (0.025 pmol), buffer de reacción 2X (5 μ L), T4 DNA ligasa (0.5 μ L) (10 u/ μ L) y agua libre de nucleasa (3.5 μ L), se colocó la muestra en una cubeta de electroporación (BIO RAD, Cat 165-2089) de espesor de 0.1 mm previamente enfriada a 4°C. Las células se transformaron por electroporación con las siguientes condiciones: 2.5kV, 25 μ F, 200 Ω (MicroPulser, BIO -RAD). Inmediatamente las células se resuspendieron en 500 μ L de medio LB, y se incubaron en agitación a 37°C, 180 rpm, por 1 h. Posteriormente, se inocularon con 50, 100, 150 y 200 μ L de las células

transformadas y recuperadas en medio LB cajas de agar LB/ampicilina 100 µg/mL. Las cajas se incubaron a 37°C por 16 h. Las cajas se incubaron a 37°C por 16 h.

Las clonas recuperadas se crecieron en medio LB con ampicilina (100 µg/mL), posteriormente se realizó la extracción de plásmido con el Kit GeneJET plasmid Miniprep, siguiendo las especificaciones del proveedor (Invitrogen). Los plásmidos obtenidos se verificaron por electroforesis. Posteriormente, los plásmidos fueron escrutados por patrón de restricción utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI, bajo las siguientes condiciones: 1 µL de plásmido (400 ng/µL), 2 µL de buffer 10x R, 0.4 µL de enzima NdeI (10 U/µL). 0.4 µL de enzima XhoI (10 U/µL) y 16.2 µL de agua libre de nucleasa. Finalmente, los plásmidos que tenían el patrón de restricción esperado fueron seleccionados, res sembrados en medio LB con agar y conservados para su posterior clonación en el sistema de expresión pET22b (Novagen, 69744).

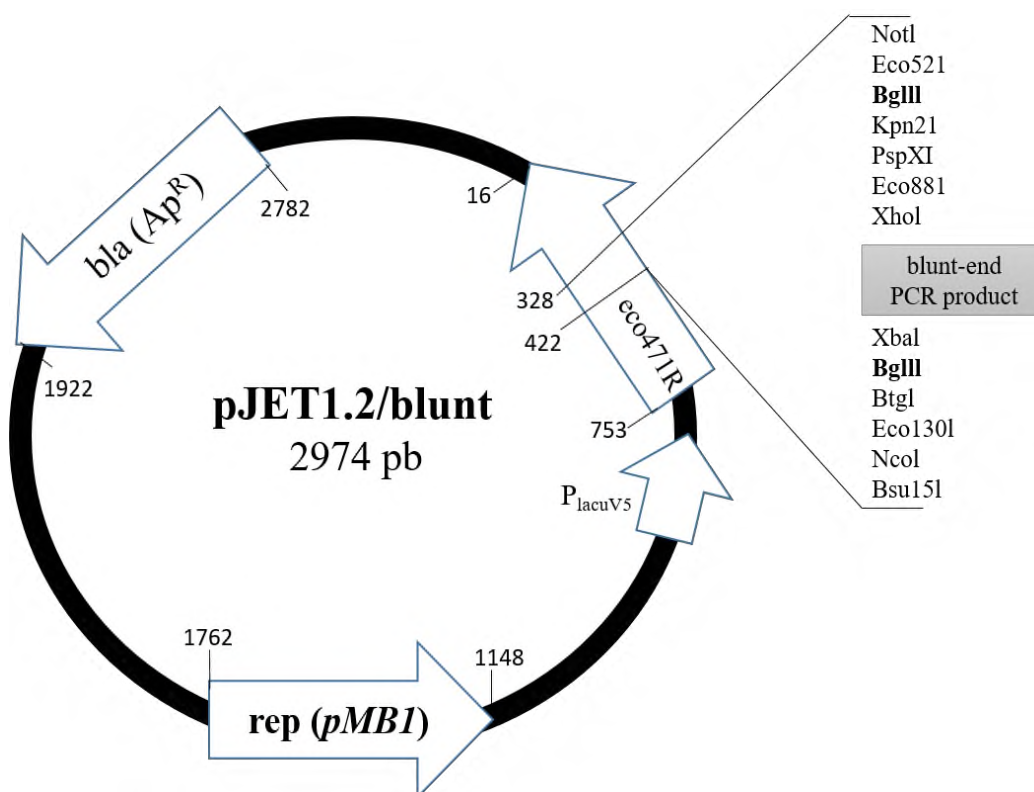


Figura 15. Plásmido pJET1.2/blunt utilizado en el presente trabajo, figura propia.

5.7.2 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido de expresión pET22b (+)

El plásmido pET22b (+) (Fig. 16) es un vector de expresión que se utilizó para clonar solamente las versiones ABC y ABCD. Este plásmido se caracteriza por tener un gen que confiere resistencia a ampicilina, es inducible por IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), además dicho plásmido contiene un parche His-Taq en el C-terminal que permite la purificación de proteínas recombinantes.

Los plásmidos pJET+ABCD y pJET+ABC se digirieron con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, posteriormente, los insertos se purificaron por banda mediante el Kit Gel Extraction QIAEXII y finalmente se clonaron en el plásmido pET22b (+) dando lugar a los plásmido pET22b+ABCD y pET22+ABC, respectivamente. Las condiciones para la reacción de ligación del inserto ABCD fueron las siguientes: Inserto purificado ABCD (1000 ng/ μ L), plásmido pET22b (200 ng/ μ L), buffer 10X (3 μ L), T4 DNA Ligasa (2 μ L) y agua libre de nucleasa (4 μ L). Las condiciones para la reacción de la ligación relación molar 1:3 (Fórmula, Anexo IV) (vector: inserto) del inserto ABC fueron las siguientes: Inserto purificado ABC (70.5 ng/ μ L), plásmido pET22b (23.5 ng/ μ L), buffer 10X (1 μ L), T4 DNA Ligasa (0.66 μ L) y agua libre de nucleasa (4.8 μ L).

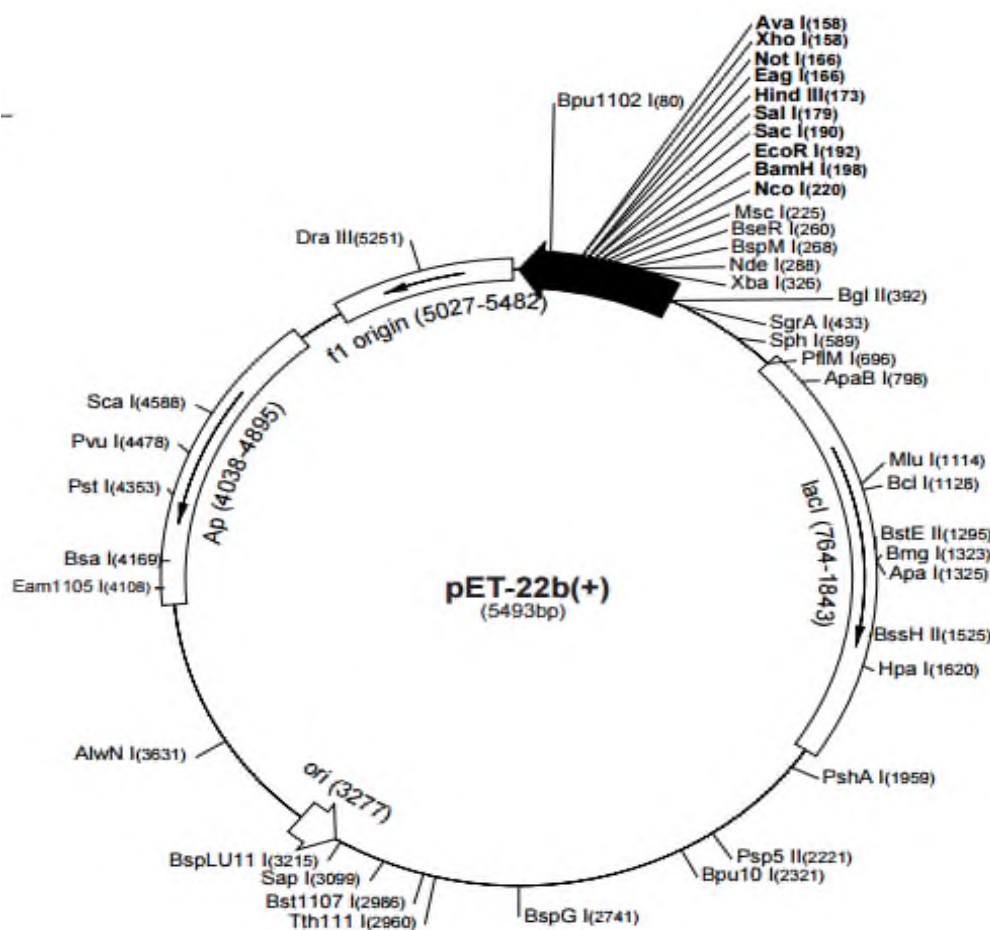


Figura 16. Plásmido pET22b (+) utilizado en el presente trabajo.

5.7.3 Clonación de los productos de PCR de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) en el plásmido de expresión pET101/D-TOPO

El plásmido pET101/D-TOPO (Fig. 17) es un vector de expresión que se utilizó para clonar las versiones truncadas AB y el SBD. Es un vector unidireccional, inducible por IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), contiene un promotor fuerte y un gen que confiere resistencia a ampicilina y permite la selección de clones positivos, además, contiene His-Tag en el C-terminal para la purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

Los productos de PCR de cada versión truncada del gen *AmyJ33* fueron clonaron el plásmido pET101/D-TOP0 (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se usaron 4 µL de producto de PCR purificado (21 ng/µL) y 0.5 µL de vector (10 ng/µL), con una relación molar inserto: vector (3:1) (Anexo IV). Las clonas obtenidas fueron analizadas por patrón de restricción.

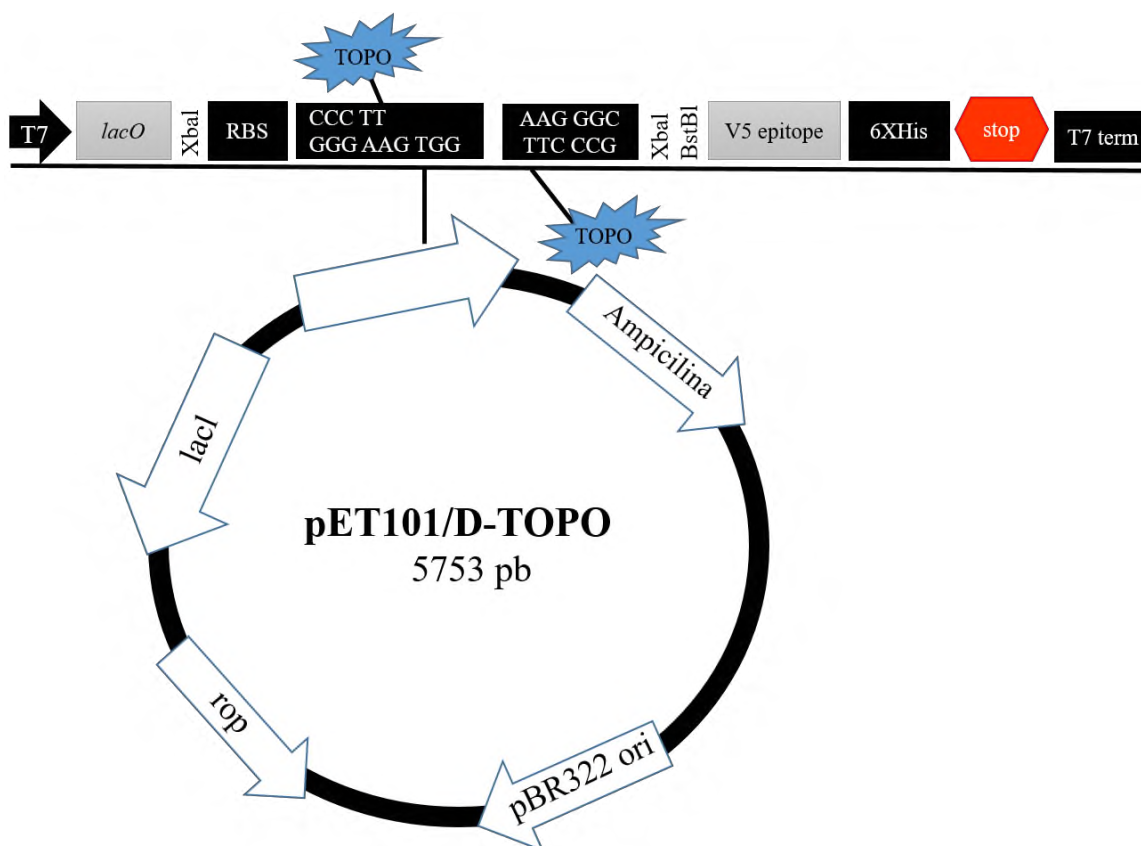


Figura 17. Mapa y características del vector pET101/D-TOP0, figura propia.

5.8 Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó 500 mL de medio YT2X (Tabla 10) con 5 mL de un cultivo que se dejó crecer toda la noche, posteriormente se inoculó en 500 mL de medio hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5 unidades, se enfrió el cultivo en hielo. Posteriormente se centrifugó 10 min a 10 000 g a 4°C, el pellet se resuspendió en 500 mL de agua MilliQ fría estéril. Se realizó una segunda centrifugación por 10 min a 10 000 g a 4°C, se resuspendió el pellet en 250 mL de

agua fría y se centrifugó por 10 min a 10 000 g a 4°C. El pellet se resuspendió en 30 mL de glicerol al 10% (preparado en agua MilliQ), posteriormente se centrifugó por 10 min a 10 000 xg, 4°C, el pellet se resuspendió en 3 mL de glicerol al 10%, finalmente se realizaron alícuotas de 40 µL y se guardaron a -80°C.

Tabla 10. Medio YT2X

Componente	Concentración (g/L)	Marca y N° catálogo
Extracto de levadura	16	BD Bacto, Cat 212750
Triptona	10	BD Bacto, Cat 211705
NaCl ₂	5	J.T B aker, Cat 3524-01

5.9 Transformación en *E. coli*

Se adicionaron 4 µL de producto de ligación a 50 µL de células de *E.coli* TOP10, la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación de 0.1 mm de espesor previamente enfriada a 4°C. Las células se transformaron por electroporación con las siguientes condiciones: 2.5kV, 25µF, 200Ω (MicroPulser, BIO -RAD). Inmediatamente, las células se resuspendieron en 500 µL de medio SOC, y se incubaron en agitación a 37°C, 180 rpm, por 1 h. Posteriormente, cajas de agar LB/ampicilina 100 µg/mL, se inocularon con 50, 100, 150 y 200 µL de las células transformadas y recuperadas en medio SOC. Las cajas se incubaron a 37°C por 16 h.

5.10 Escrutinio de las células transformadas

Se seleccionaron 70 clonas transformadas, se pasaron por duplicado a cajas nuevas de agar LB/ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37°C por 16 h. Las clonas que crecieron en las cajas con ampicilina fueron inoculadas por separado en 5 mL de caldo LB/ ampicilina 100 µg/mL y se incubó a 37°C, 180 rpm, por 16 h, para generar células y así extraer el plásmido. La extracción de plásmido se realizó con el kit GeneJET plasmid Miniprep (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del proveedor. Los plásmidos fueron

digeridos con las enzimas de restricción Nde1 y XhoI y posteriormente fueron corroborados mediante electroforesis.

5.11 Secuenciación y análisis de secuencias nucleotídicas

Las clonas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC, AmiJ33-AB y el SBD) de las versiones truncadas de la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M fueron secuenciadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos). Las secuencias se analizaron en el servidor Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y fueron traducidas en el servidor ExPASy (<https://www.expasy.org/>). El marco de lectura abierto se confirmó con el servidor ORF (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html).

5.12 Técnicas enzimáticas y bioquímicas

5.12.1 Ensayo de actividad en cajas Petri de las versiones truncadas de AmiJ33

Las clonas BL21+ABCD, BL21+ABC, BL21+AB se inocularon por duplicado en cajas Petri con medio agar/LB/ampicilina 100 μ g/mL/almidón 1% (p/v)/ 0.1 mM, 0.5 mM y 1.0 mM de IPTG, y se incubaron a 37°C por 24 h. Después del tiempo de incubación, se realizó el revelado de la actividad amilasa incorporando a la caja Petri una solución de lugol (0.33% p/v de I y 0.66% p/v de KI). Las clonas con actividad enzimática mostraron un halo de degradación (transparente). Como control positivo y negativo se utilizaron *B. amyloliquefaciens* JJC33M y *E. coli* BL21 sin plásmido, respectivamente, las cuales fueron inoculadas en medio LB/almidón 1% (p/v) y se incubaron a 37°C por 24 h.

5.12.2 Sobreexpresión y obtención de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC, AmiJ33-AB y el SBD) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) fue utilizada para la expresión de las versiones truncadas (AmiJ33-AB, AmiJ33-ABC, AmiJ33-ACBD y el SBD) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Se tomó un vial de cada célula transformada de *E. coli* BL21, almacenadas en glicerol a -20°C, que contenía el plásmido de interés y se inoculó al 5% en 50 mL de medio LB/ampicilina 100 μ g/mL. Posteriormente, el inóculo se incubó a 37°C por 16 h a 200 rpm hasta alcanzar 0.5 unidades de DO_{600nm}, en ese punto los cultivos fueron

inducidos con diferentes concentraciones de IPTG; 0.1 mM, 0.5 mM y 1.0 mM. Las células siguieron creciendo hasta alcanzar $DO_{600nm} = 2$ U (aproximadamente 8 h) y se colectaron por centrifugación a 5,500 rpm durante 10 minutos a 4°C; posteriormente fueron lavadas 3 veces con amortiguador fosfato 50 mM pH 7.0; enseguida el pellet fue resuspendido con 1 mL de amortiguador fosfatos 50 mM pH 7.0. El sobrenadante obtenido después de la fermentación fue colectado para realizar pruebas de actividad DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Las células que contenían el gen que codifica para la α -amilasa AmiJ33-AB y la región putativa SBD se lisaron utilizando el reactivo Bugbuster 1X (éste reactivo está formulado para romper suavemente la pared celular de *E. coli*, liberando proteína soluble. Proporciona una alternativa, sencilla, rápida y económica a métodos mecánicos como la french press o la sonicación) (NOVAGEN) y las células que contenían el gen que codifica para la α -amilasa AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD se lisaron utilizando el método de choque osmótico (sección 5.12.2.1).

5.12.2.1 Extracción de las proteínas de interés; AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD por el método de choque osmótico

AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD fueron clonadas en el plásmido pET22b (+). La extracción y purificación de las proteínas localizadas en el periplasma de la célula se realizaron por el método de choque osmótico, esto debido a que la concentración de proteína para AmiJ33-ABCD tanto del sobrenadante como del pellet lisado fue similar, 450.5 μ g/mL y 458.6 μ g/mL, respectivamente. Es decir, hay casi un 50% y 50% de proteínas tanto en sobrenadante como en el pellet. Por tal motivo se decidió utilizar el método de choque osmótico, además de que existen reportes (Sokolosky y Szoka, 2014) sobre proteínas extraídas utilizando este método y obteniendo finalmente una proteína casi pura.

El pellet se resuspendió en una solución hipertónica (20% de sacarosa, 30 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA) (1.25 mL para un cultivo de 50 mL) y se incubó durante 30 min a 50 rpm a 4°C en un agitador de placas (Labnet international Inc.). Posteriormente, se centrifugó la muestra a 13 000 rpm por 5 min, el sobrenadante obtenido se guardó a 4°C y el pellet se volvió a resuspender en una solución hipotónica (5mM de $MgSO_4$) (300 μ L) donde se incubó durante 30 min a 50 rpm a 4°C, después de la incubación se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm a 4°C. El sobrenadante de la solución hipertónica se combinó con el sobrenadante de la

solución hipotónica y se centrifugó por 3 min a 13 000 rpm, esto para eliminar los restos celulares.

5.12.2.2 Extracción de las proteínas de interés; AmiJ33-AB y el SBD utilizando el reactivo Bugbuster 1X

La extracción y purificación de las proteínas del pellet se realizaron utilizando el reactivo Bugbuster 1X (5 mL de Bugbuster 1X para 1g de células peso húmedo) y se incubó la suspensión celular por 20 min a 400 rpm a 25°C. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular por 5 min a 13 000 rpm y se separó el sobrenadante del pellet, el sobrenadante contenía la proteína soluble. Finalmente, se dializaron las muestras con amortiguador fosfatos pH 7.0, 50 mM durante toda la noche.

5.12.3 Purificación de las versiones truncadas por cromatografía de afinidad

Las soluciones obtenidas (de AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD) por el método de choque osmótico y las soluciones obtenidas (de AmiJ33-AB y el SBD) por el reactivo Bugbuster 1X se purificaron por medio de cromatografía de afinidad en condiciones nativas con una resina de Ni-NTA (QIAGEN®) y en batch bajo las siguientes condiciones; la resina (1 mL) se equilibró con 2 mL de amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM). Posteriormente, se agregaron 4 mL de la mezcla extracto enzimático-amortiguador de lisis 2X en proporción 1:1, a la resina equilibrada. Esta mezcla se incubó a 4°C, 120 rpm, por 2 h. La muestra se cargó en una jeringa de 5 mL que se utilizó como soporte, previamente preparada con cuatro discos de papel filtro de 0.4 μm en el fondo para retener la resina. Se realizaron 5 lavados con 0.5 mL de amortiguador de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) para eliminar las proteínas contaminantes. El procedimiento anterior se realizó para cada versión truncada. Las versiones truncadas fueron eluidas con 4 volúmenes de 0.5 mL de amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM). El pH de los amortiguadores de lisis, lavado y elución se ajustaron a 8.0 con NaOH. El flujo, los lavados y las eluciones se analizaron en SDS-PAGE 10%. Las versiones truncadas purificadas se dializaron con membranas de diálisis en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 durante toda la noche para eliminar el imidazol.

15.12.4 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó por duplicados realizando la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 10 g/L de almidón en amortiguador, temperatura y pHs de acuerdo como lo indica cada experimento (efecto de pH y temperatura, estabilidad a pH y termoestabilidad y generación de productos de hidrólisis), mediante la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácidodinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540nm de los azúcares reductores (Lambda 25 L600-00BB Perkin Elmer). Esta técnica es utilizada para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática. (Miller, 1959). Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para generar un μmol de azúcar reductor, equivalente a glucosa, por minuto.

5.12.5 Electroforesis de proteínas

Para analizar la expresión de las versiones truncadas. Los sobrenadantes obtenidos después de la fermentación, las proteínas obtenidas por choque osmótico, las proteínas obtenidas por el reactivo Bugbuster 1X y las proteínas obtenidas de la purificación por columnas Ni-NTA se resuspendieron en amortiguador de carga SDS-PAGE 2X en proporción 1:1 y se calentaron en baño maría a 100°C por 5 min. Posteriormente, se cargaron 15 μL de cada muestra y las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE 10% (para el caso de AmiJ33-AB, AmiJ33-ABC, AmiJ33-ABCD) y SDS-PAGE 17%, (para el SBD). Se usó la cámara de electroforesis vertical para geles de 1 mm de espesor (Mini-PROTEAN Tetra System BIO -RAD). El gel concentrador se preparó al 4% y el gel separador al 10% o 17% (las proteínas que se logran separar bajo estas condiciones pesan entre 14-200 kDa (aplica para 10 y 17% SDS-PAGE)). La migración se efectuó a un amperaje constante de 25mA por gel. Se utilizó como amortiguador de corrida una solución de tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L y SDS 5 g/L y como amortiguador de carga una solución de tris 1M pH 6.8, glicerol 1 mL, SDS 0.2g, β -mercaptoetanol 0.5 mL y azul de bromofenol 0.5% (p/v).

Posterior a la electroforesis, el gel se tiñó durante 20 min en una solución de ácido acético glacial 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de Coomassie 0.2% (v/v). Después, el gel se lavó para eliminar los excesos del colorante con una solución de ácido acético glacial 10% (v/v) y metanol 30% (v/v) y agua 60% (v/v).

5.12.6 Zimograma

El zimograma para las versiones truncas AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC y AmiJ33-AB se realizó en SDS-PAGE desnaturizante (Laemmli, 1970; Martínez *et al.*, 2000 y Hernández-Heredia y del Moral S, 2016) con las modificaciones de la tabla 11. El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida sin adición de almidón, el gel separador se preparó al 10% de acrilamida adicionado con almidón soluble 0.1% marca Eslab, concentración final. La migración se efectuó a 25 mA por gel, al término de la electroforesis el gel se incubó por 1 h a 4°C, 60 rpm (se utilizó el agitador de placas Labnet international Inc.) con una solución de 2.5% (v/v) de tritón X-100 para remover el SDS y renaturalizar las enzima. Posteriormente, al gel se le realizaron lavados con agua destilada para remover el exceso de tritón, y se incubó por 45 min a 4°C con una solución de 10 g/L de almidón gelatinizado para asegurar la penetración del almidón dentro de la matriz de acrilamida. Después de la incubación en frío, el mismo gel se incubó (Excella E24 Incubator, New Brunswick Scientific) a 37°C por 1 h con amortiguador fosfatos pH 7.0 y se reveló con solución de lugol (0.33% p/v de I y 0.66% p/v de KI). La actividad de la enzima se observó mediante zonas claras en el gel, lo cual indica la hidrólisis del almidón. Se utilizó la luz blanca de un transiluminador (Benchtop UV transilluminator, UVP) para observar la banda de hidrólisis.

Tabla 11. SDS-PAGE copolimerizado con almidón

Reactivo	Gel concentrador 4%	Gel separador 10%
Poliacrilamida	0.65 mL	3.3 mL
Amortiguador 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL	----
Amortiguador 1.5M Tris-HCl, pH 8.8	----	2.5 mL
Almidón soluble 1% (p/v)	----	0.52 mL
Agua destilada	3.05 mL	4.1 mL
SDS 10% (p/v)	50 µL	0.1 mL
TEMED	5 µL	5 µL
10% p/v Persulfato de amonio	50 µL	50 µL

5.12.7 Caracterización bioquímica de la clona con actividad enzimática, AmiJ33-ABCD

5.12.7.1 Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de AmiJ33-ABCD de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se realizó incubando la enzima por 1 h a 4°C, con los amortiguadores correspondientes (amortiguador de glicina-HCL para pH 3.0 amortiguador, amortiguador de acetatos para pH 4.0 y 5.0, amortiguador de fosfatos para pH 6.0, 7.0, 8.0 y amortiguador de glicina-NaOH para pH 9.0). Para realizar el experimento se incubó 1.5 U de enzima a los diferentes pHs de estudio (desde 3.0 hasta 9.0) a 4°C por 1 h, este paso fue necesario para que AmiJ33-ABCD se estabilizara al pH de estudio y así se pudiera evaluar el efecto del pH, al término de ese tiempo se adicionó almidón soluble 10 g/L (almidón gelatinizado en amortiguador a los diferentes pHs de estudio).

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa, se midió la actividad a 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C a diferentes tiempos, pH 8.0 (pH óptimo previamente

demostrado) en amortiguador fosfatos, incubando previamente el almidón 5 min a la temperatura evaluada.

La actividad enzimática de AmiJ33-ABCD se determinó tal cual se menciona en la sección 15.12.4.

5.12.7.2 Termoestabilidad y vida media de AmiJ33-ABCD

Para determinar la termoestabilidad de AmiJ33-ABCD se incubó la enzima por 1 h a 40, 50 y 60°C, tomando alícuotas a diversos tiempos, a las que se les determinó actividad residual a 45°C usando como sustrato almidón 10 g/L a pH 8.0 (pH óptimo). La actividad enzimática residual se determinó por duplicado (sección 15.12.4). Con estos datos se calculó la vida media de la enzima ($t_{1/2}$) y la constante de desactivación de primer orden k . A partir de la siguiente expresión:

$$\ln A = -kt + \ln A_o$$

Se obtiene la siguiente ecuación

$$\ln \frac{A}{A_o} = -kt$$

Donde:

A_o = Actividad inicial

A = Actividad a determinado tiempo

Por tal motivo la ecuación para calcular la vida media queda de la siguiente manera:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

5.12.7.3 Estabilidad en diferentes pHs

La enzima AmiJ33-ABCD se incubó por 24 h a 4°C, a diferentes pH (amortiguador de glicina-HCl para pH 3.0, amortiguador de acetatos para pH 4.0 y 5.0, amortiguador de fosfatos para pH 6.0, 7.0 y 8.0, amortiguador de Glicina-NaOH 50mM para pH 9.0). Al

término de la incubación, se agregaron 10 g/L de almidón gelatinizado (soluble). La actividad enzimática residual se determinó tal cual se menciona en la sección 15.12.4.

5.12.7.4 Determinación de parámetros cinéticos V_{max} y K_m

Se evaluó el efecto de la concentración del sustrato (almidón gelatinizado) en la velocidad de reacción, para ello se emplearon diferentes concentraciones del almidón (1-16 mg/mL) y se determinó la actividad de AmiJ33-ABCD. La determinación de la velocidad de reacción se realizó a pH 8.0 (pH óptimo) y 45°C mediante la medición de azúcares reductores por la técnica del DNS (ácido 3,5dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La velocidad máxima que puede alcanzar una enzima (V_{max}) y la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) se calcularon mediante la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis Menten con el software OriginLab9.0 (Versión 9.0).

Ec. Michaelis Menten:

$$V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

5.12.7.5 Determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial usando AmiJ33-ABCD

Para la determinación de los productos de hidrólisis del almidón comercial por medio de AmiJ33-ABCD, se incubó 1.5 U de enzima a 45°C a pH 8.0, posteriormente se adicionó como sustrato almidón gelatinizado 10 g/L (marca Eslab), se tomaron 100 µL de muestra a distintos tiempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 minutos. Los productos de hidrólisis se observaron mediante cromatografía en capa fina (TLC).

La actividad enzimática se determinó como se menciona en la sección 15.12.4.

5.12.7.6 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas comerciales de sílica gel 60 GF₂₅₄, de 10 cm x 10 cm x 0.25 mm, Merck. Las placas se desarrollaron en el sistema de fase móvil: butanol/etanol/agua (30/50/20) v/v/v, mediante una técnica ascendente con desarrollo simple. Se colocó 1µl de

cada muestra hidrolizada así como de los estándares de maltodextrinas, 2-7 grados de polimerización (GP), las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por unos segundos, posteriormente, la placa se colocó en una cámara cromatográfica. La cromatografía se detuvo cuando la fase móvil recorrió 8.5 cm, para ello se retiró la placa de la cámara. Posteriormente, la placa se secó a temperatura ambiente, ésta se asperjó con una solución de α -naphthol (5 g de α -naphthol, 171.85 mL de etanol, 13.71 mL de agua y 22.28 mL de H_2SO_4) y se secó con aire caliente 70°C.

5.12.8 Ensayos de adsorción de la región putativa SBD, AmiJ33-ABCD con almidón nativo

5.12.8.1 Adsorción del SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M en almidón nativo (crudo)

Para evaluar la funcionalidad del SBD se realizaron ensayos de adsorción utilizando almidón nativo de papa (Eslab) y de maíz. Como controles se utilizó BSA (albúmina de suero bovino) y la clona AmiJ33-ABCD. La adsorción de las proteínas en almidón nativo se determinó añadiendo 100 μ g/mL de enzima purificada en 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de almidón nativo (marca Eslab) resuspendido en amortiguador fosfato pH 7.0, 50 mM. La mezcla se incubó a 4°C en un agitador de placas a 120 rpm por 2 horas. Después de 2 horas, la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min, posteriormente se recolectó el sobrenadante para la determinación de proteínas. La concentración de proteína en el sobrenadante fue restado de la cantidad total de proteína unida (Kanpiengjai *et al.*, 2017). La proteína libre obtenida del sobrenadante se detectó mediante la técnica de Bradford y SDS-PAGE 17%.

5.12.8.2 Adsorción de almidón nativo (crudo) de Maíz

La adsorción del SBD en almidón nativo se determinó añadiendo 100 μ g/mL de enzima purificada en 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de almidón nativo (marca MEYER) resuspendido en amortiguador fosfato pH 7.0, 50 mM. La mezcla se incubó a 4°C en un agitador de placas a 120 rpm por 2 horas. Después de 2 horas, la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min, posteriormente se recolectó el sobrenadante para la determinación de proteínas. La concentración de proteína (determinada por la técnica de Bradford) en el sobrenadante fue restado de la cantidad total de proteína unida (Kanpiengjai *et al.*, 2017). Como control negativo se utilizó la proteína BSA (albúmina de suero bovino) y como control

positivo se usó la clona AmiJ33-ABCD. Los controles positivos y negativos se trabajaron bajo las mismas condiciones experimentales, mencionadas anteriormente. Las cantidades de enzimas libres en el sobrenadante se detectaron mediante SDS-PAGE 17%.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Modelado *in silico* de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

6.1.1 Evaluación de la estructura tridimensional de AmiJ33r sin péptido señal

Se utilizaron tres servidores para modelar la estructura tridimensional de AmiJ33r sin el péptido señal, el primer servidor fue I-TASSER, el resultado se muestra en la figura 18. El modelo que arrojó I-TASSER está conformado por cinco dominios; dominio A, dominio B, dominio C, dominio D y el dominio E, el molde que utilizó I-TASSER fue 1QHO (α -amilasa de *B. stearothermificus*). En cuanto a las calificaciones, tiene un TM-Score de 91% y una identidad con AmiJ33r del 17%. Por otro lado, la evaluación de PROCHECK en el diagrama de Ramachandran (Fig. 19), nos indica que más de 100 aminoácidos se encuentran en la zona menos favorable (zona blanca), esto quiere decir, que no se sabe qué tipo de estructura secundaria tendría dicha región (α -hélice, β -lámina o loops). Por lo tanto, es poco confiable utilizar este modelo. Cabe resaltar que I-TASSER es un servidor específico para modelar sólo dominios y no proteínas completas (multidominio), esto no quiere decir que no se puedan modelar, sin embargo la confiabilidad es menor. Por lo que se decidió utilizar otro servidor.

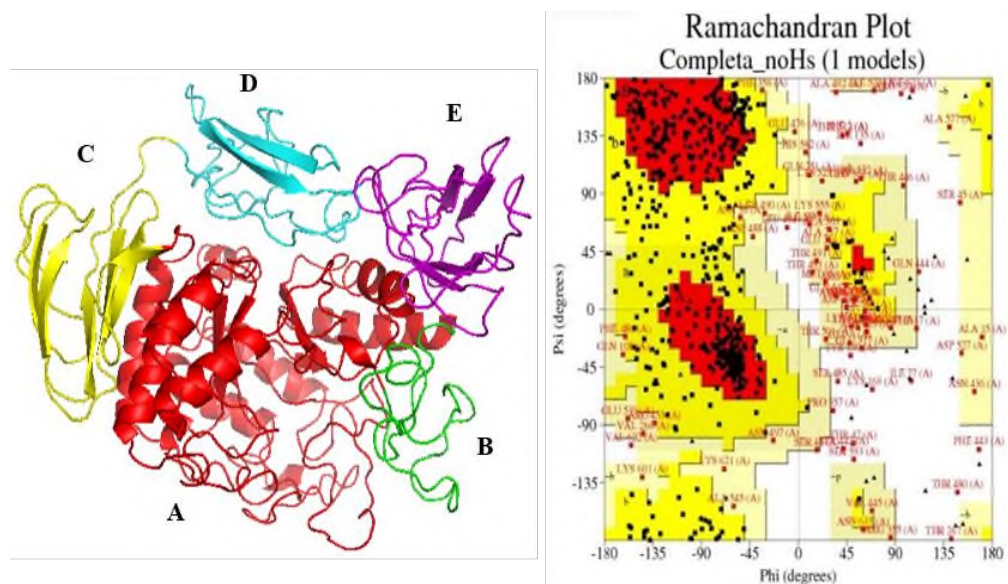


Figura 18. Estructura tridimensional, modelada por I-TASSER y diagrama de Ramachandran, evaluado por Procheck.

El segundo servidor utilizado para evaluar el modelo tridimensional de AmiJ33r fue SWISS-MODEL, el cual se caracteriza por realizar el modelado por homología de estructuras proteicas en 3D y comprende cuatro pasos principales: identificación de plantillas estructurales, alineación de secuencia objetivo-plantilla, construcción de modelo/minimización de energía y finalmente, evaluación de la calidad del modelo (QMEAN). El resultado del modelo proteico de SWISS-MODEL se muestra en la figura 19A. El programa sólo logró hilvanar los dominios; A, B y C. Sin embargo, ese modelo no es confiable, dado que en la secuencia se observa que se truncaron cuatro aminoácidos del dominio A y cinco aminoácidos del dominio C y por consecuencia no se modelaron los dominios restantes; el dominio D y el dominio E (Fig. 19B). Por lo tanto, SWISS-MODEL se descarta como candidato para modelar la estructura 3D de AmiJ33r, ya que no cumplió con las características y calificaciones adecuadas (C-Score, TM-Score y % de identidad).

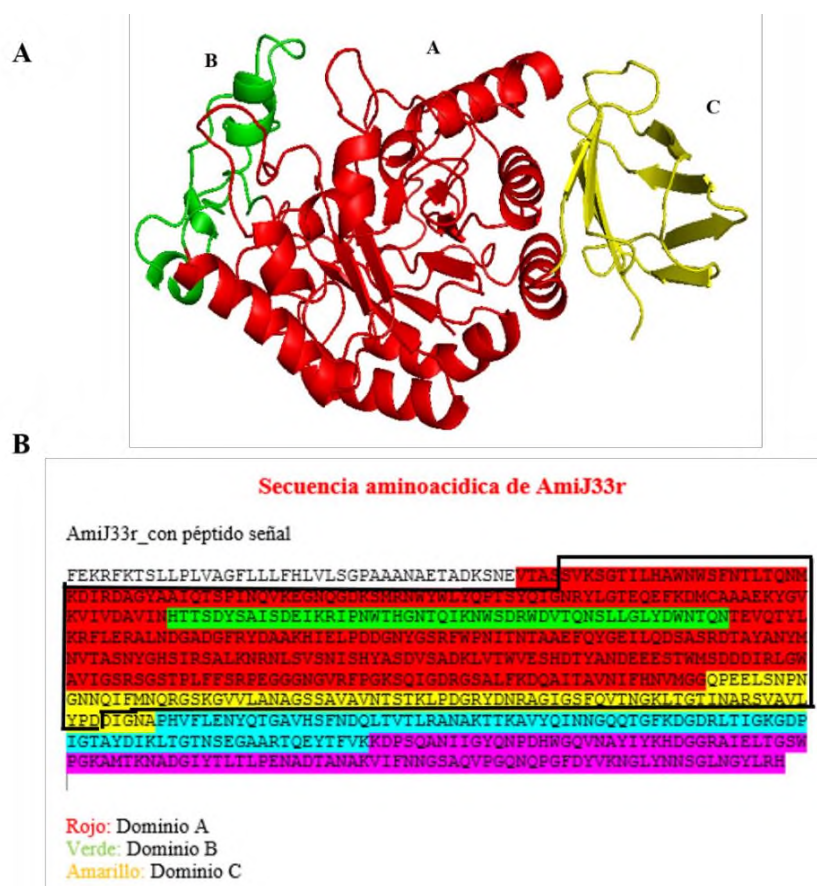


Figura 19. Estructura tridimensional, modelada por SWISS-MODEL y secuencia aminoacídica de AmiJ33r.

El tercer servidor que se utilizó para evaluar la estructura 3D de AmiJ33r fue Raptor X, éste se caracteriza por modelar proteínas por homología mediante estructuras 3D, de *novo* y por aprovechar la información de la estructura (secundaria y terciaria) de la proteína para realizar el hilvanamiento (Roy *et al.*, 2010), por lo que se utilizó éste servidor para modelar AmiJ33r, el resultado se muestra en la figura 21. Raptor X utilizó como molde a 1BAG, que es una α -amilasa de *B. subtilis* y tiene una identidad con AmiJ33r del 91%, y está conformada por cinco dominios; dominio A, dominio B, dominio C, dominio D y el dominio E. El modelo predicho por Raptor X fue evaluado con el servidor PROCHECK, en el diagrama de Ramachandran (Fig. 20). Se observó que alrededor de 8-10 aminoácidos caen en la región menos favorable (zona blanca), este resultado comparado con el modelo de I-TASSER nos ayuda a concluir que el mejor servidor para predecir dicha estructura es Raptor X, además Raptor X en comparación con I-TASSER fue el servidor más rápido en modelar la estructura (referente a tiempo, Raptor X de 5-10 min e I-TASSER de 3-5 días). En este modelo se observa que los dominios D y E presentan una estructura secundaria tipo β -plegada. El dominio E (SBD) está cerca del dominio catalítico. En cambio el modelo que arrojó I-TASSER era similar a la de una ciclodextrina glucanotransferasas (proteína globular) cuya función es convertir el almidón en ciclodextrinas, función que no es similar a la de las α -amilasas.

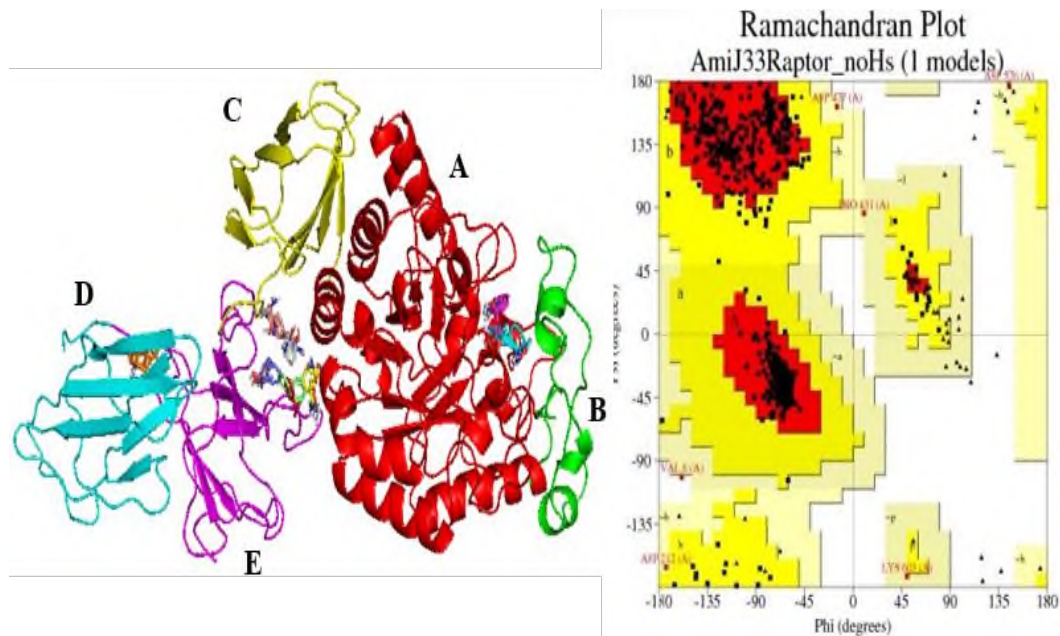
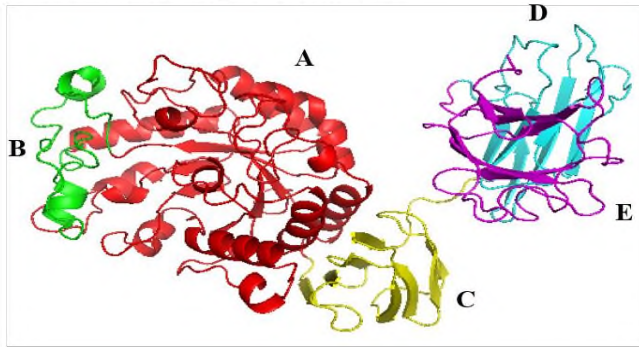


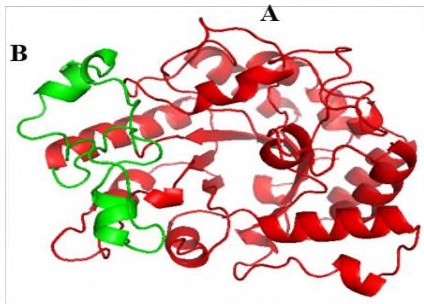
Figura 20. Estructura tridimensional, modelada por Raptor X y diagrama de Ramachandran, evaluado por Procheck.

Una vez evaluados los modelos 3D de AmiJ33r generados por los servidores I-TASSER, SWISS-MODEL y Raptor X, el mejor modelo calificado fue el predicho por Raptor X. Este modelo se utilizó como molde para predecir las estructuras 3D de las versiones truncadas de AmiJ33r mediante el servidor PyMol. Los resultados de las estructuras 3D se muestran en la figura 21. En la figura 22 se muestra la estructura primaria de cada versión truncada de AmiJ33r.

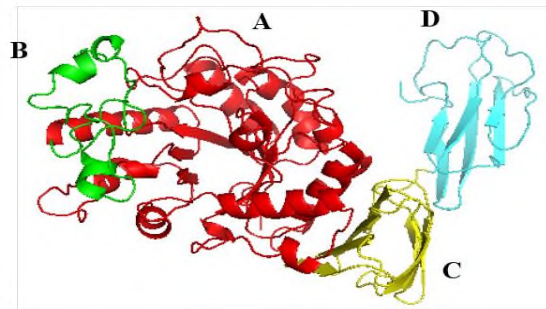
A). Versión completa, AmiJ33r



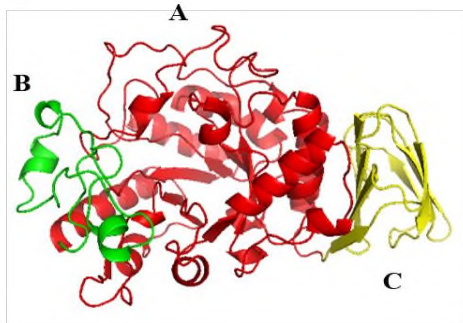
B). Versiones truncadas de AmiJ33r



AmiJ33 AB



AmiJ33 ABCD



AmiJ33 ABC



SBD

Figura 21. Modelo 3D de las versiones truncadas de AmiJ33r, diseñados en PyMol. Los dominios de las estructuras 3D son identificados por colores y letras: letra A: dominio A e identificado por el color rojo, letra B: dominio B e identificado por el color verde, letra C: dominio C e identificado por el color amarillo, letra D: dominio D y color cyan, letra E: dominio E y color púrpura.

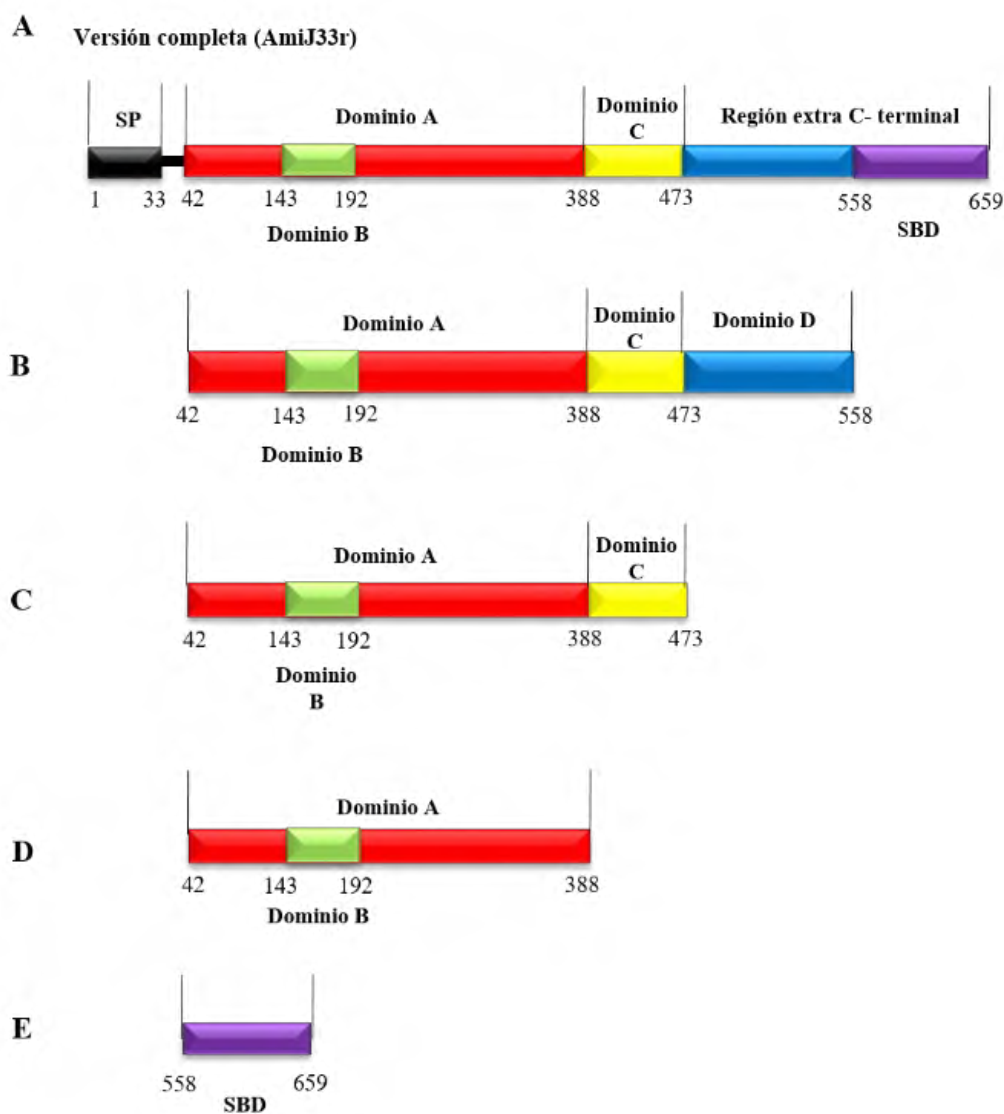


Figura 22. Estructuras (dominios) de las versiones truncadas de AmiJ33r. A). AmiJ33r. B). AmiJ33-ABCD. C). AmiJ33-ABC. D). AmiJ33-AB. E). SBD.

Como se observó en otros estudios (Montor-Antonio *et al.*, 2017), la α -amilasa AmiJ33r contiene una región SBD putativa la región C-terminal. La funcionalidad del SBD está relacionada con tres aminoácidos aromáticos implicados en la unión al almidón: Trp, Phe y Tyr, que están implicados en la unión a almidón, además de algún enlazador para que pueda cumplir su función (Boraston *et al.*, 2004, Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2009). En el caso de AmiJ33r, a través del alineamiento de la región SBD con la región análoga de la α -amilasa

de *Bacillus. sp.* (O24781) y de la α -amilasa de *B. circulans* (A0P8X0) se encontró que tiene los tres aminoácidos conservados mencionados anteriormente (Fig. 23A). En la figura 23B, la región encerrada en un círculo muestra el sitio de unión a sustrato en el dominio E (SBD) con los aminoácidos aromáticos: Tyr 538, Tyr 540, Trp 554 y Phe 599. Con base en este análisis se sugiere que el SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M podría ser funcional. Para ello será necesario determinar su capacidad de unión a almidón nativo por medio de ensayos de adsorción proteína-almidón.

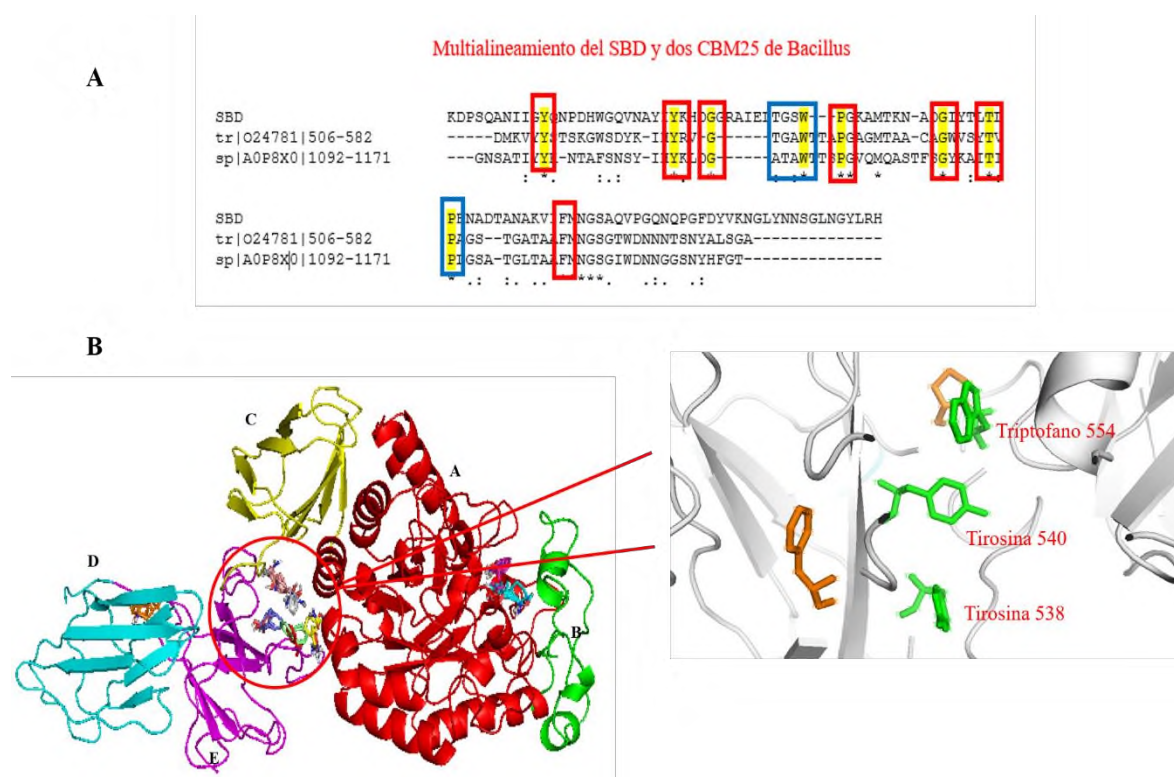


Figura 23. Análisis del SBD (CBM25) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A). Multialineamiento de CBM26. B). Aminoácidos conservados involucrados en la unión a almidón.

6.2 Subclonación y clonación de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

Para clonar las versiones truncadas del gen *amyJ33S*, se amplificaron los productos de PCR donde se usó como templado el ADNg de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (47 ng/ μ L con una pureza de 1.94 relación 260/280 nm) y los oligonucleótidos de la tabla 10, dando lugar a diversos productos de PCR de tamaño diferente (Fig. 24 y tabla 12).

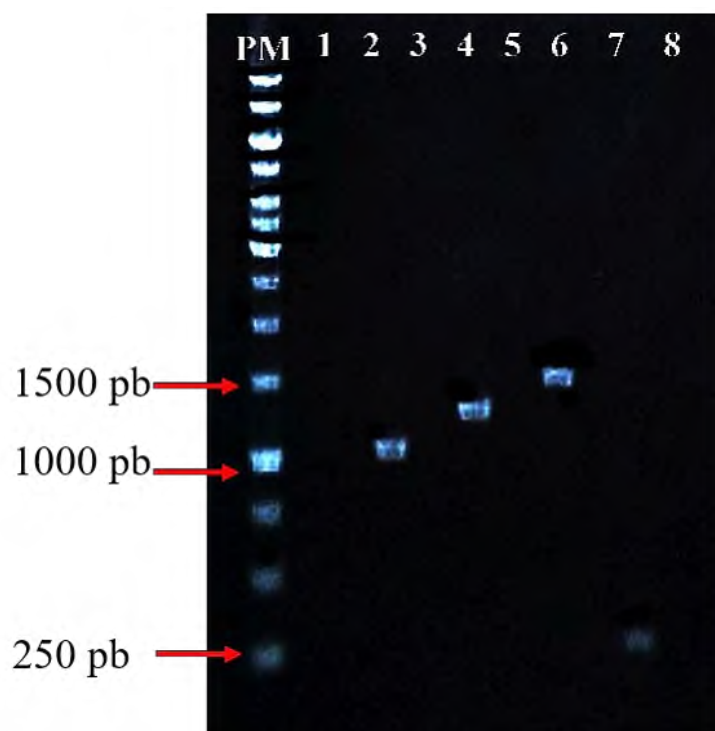


Figura 24. Productos de PCR para la construcción de las versiones de AmiJ33; PM: Marcador de peso molecular 1 kb. 1: Control (-). 2: AmiJ33-AB. 3: Control (-). 4: AmiJ33-ABC. 5: Control (-). 6: AmiJ33-ABCD. 7: Control (-). 8: SBD.

Tabla 12. Construcciones y tamaño de los productos de PCR de las versiones truncadas

Construcción	Producto de PCR (pb)
pET101-D/TOPO+AB	1041
pET22b+ABC	1290
pET22b+ABCD	1545
pET101-D/TOPO+SBD	309

6.3 Construcción de las versiones AmiJ33-ABCD y AmiJ33-ABC en pET1.2/blunt y pET22b (+)

En la clonación de las versiones truncadas AmiJ33-ABCD y AmiJ33-ABC se utilizaron dos vectores, uno de clonación (pJET.2/blunt) y el otro de expresión (pET22b) con la finalidad de garantizar y optimizar la clonación.

Una vez obtenidos los productos de PCR de las versiones truncadas, se realizó la clonación de las versiones AmiJ33-ABC y AmiJ33-ABCD en el plásmido pJET1.2/blunt. Posteriormente, la clonas pJET1.2/blunt+ABCD y pJET1.2/blunt+ABC fueron digeridas con las enzimas de restricción NdeI y XhoI (Fig. 26A y Fig 27), dando lugar a una banda de 1545 y 1290 pb, respectivamente. Las cuales fueron subclonadas en el vector de expresión pET22b (Fig. 25B y 26).

En la clonación de AmiJ33-ABC sólo se obtuvieron 4 clonas las cuales fueron analizadas por patrón de restricción y secuenciación, dónde las 4 clonas fueron positivas (Fig. 27).

Por otro lado, en la clonación de AmiJ33-ABCD se obtuvieron 20 clonas, de las cuales se seleccionaron 6 que se analizaron por patrón de restricción y sólo se obtuvo una clona positiva. Los resultados se muestran en la Fig. 28.

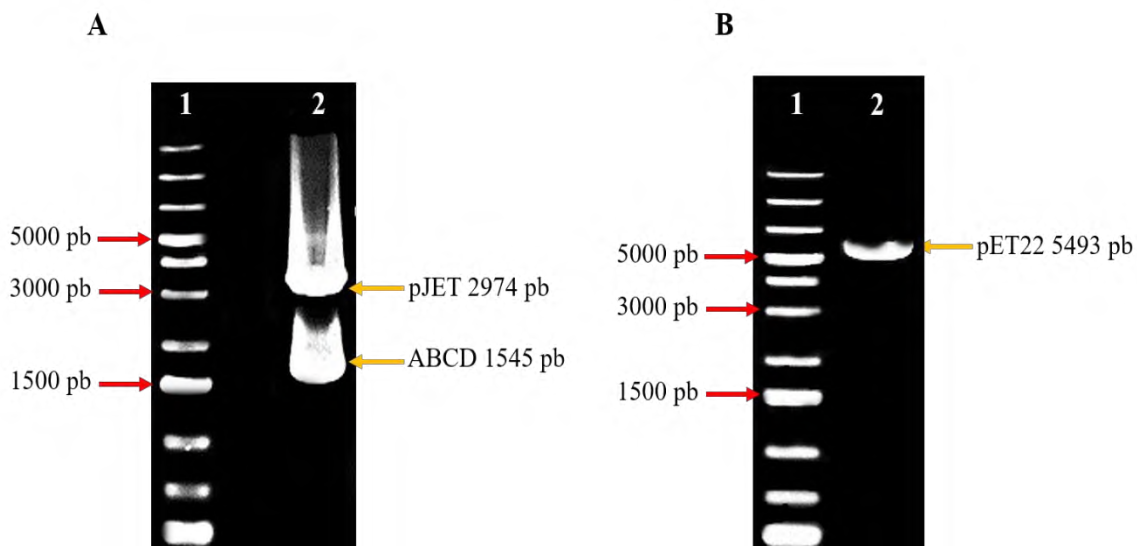


Figura 25. Clonación de la versión truncada AmiJ33-ABCD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A. Digestión del plásmido pJET1.2/blunt+ABCD con las enzimas Nde1 y Xho1; carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2: plásmido digerido. B. Digestión del plásmido pET22b. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Plásmido digerido.

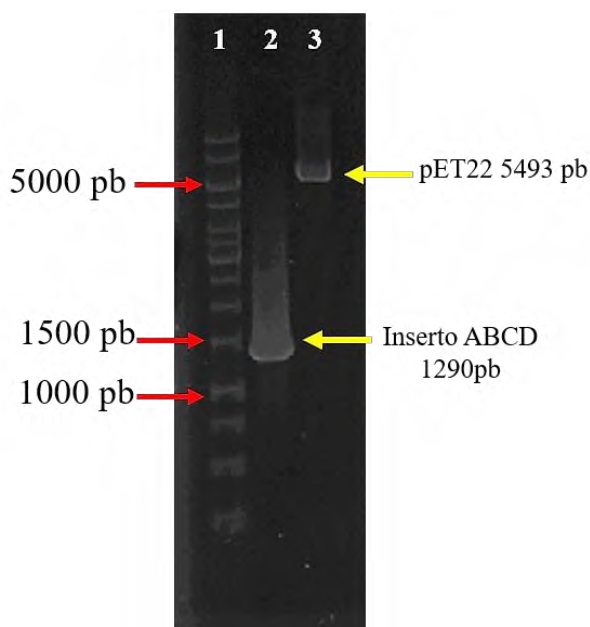


Figura 26. Clonación de la versión truncada AmiJ33-ABC de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A. Digestión del plásmido pJET1.2/blunt+ABC con las enzimas Nde1 y Xho1; carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: inserto ABC digerido y purificado.

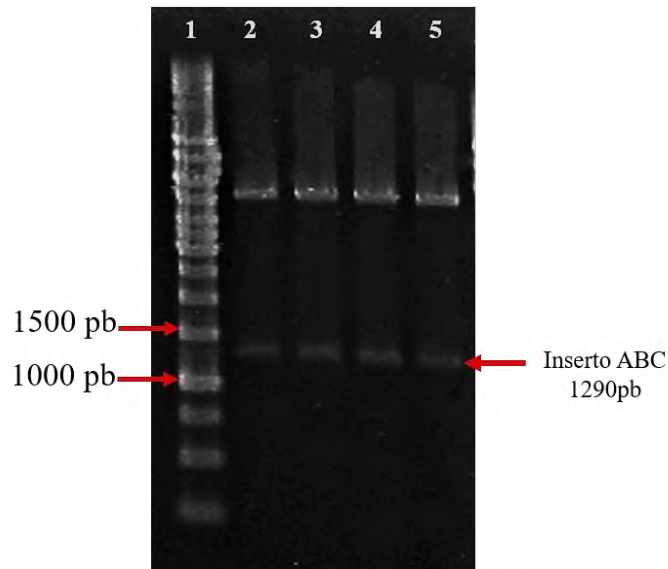


Figura 27. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-ABC de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Digestiones de las clonas pET22b+ABC con las enzimas Nde1 y Xho1. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2-5: inserto ABC digerido y purificado.

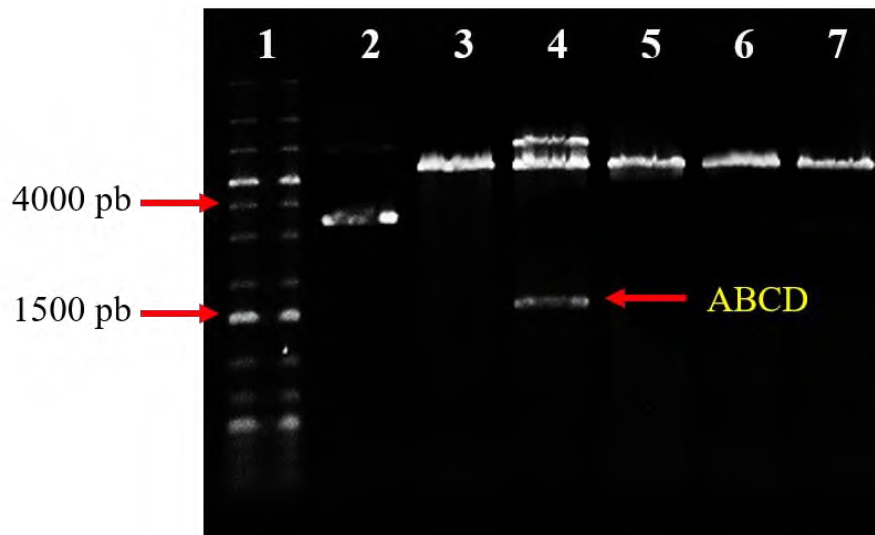


Figura 28. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-ABCD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Digestiones de las clonas pET22b+ABCD con las enzimas Nde1 y Xho1. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2-7: Plásmido digerido de las clonas obtenidas.

6.3.1 Clonación de las versiones AmiJ33-AB y el SBD en pET101D/TOPO

Usando los oligonucleótidos adecuados (Tabla 6) y como molde el ADN_g de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se obtuvieron los productos de PCR de las versiones truncadas, posteriormente se realizó la clonación de AmiJ33-AB y el SBD en el plásmido pET101D/TOPO, éste plásmido se utilizó inmediatamente cuanto arribó al laboratorio, ya que inicialmente se seleccionó para realizar la clonación de todas las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. El plásmido pET101D/TOPO se eligió por las características mencionadas en la sección 6.2. Después de haber obtenido los plásmidos pET101+AB y pET101+SBD se realizaron las digestiones con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, dando lugar a una banda de 1041 y 309 pb, respectivamente (Figs. 29 y 30).

En la clonación de AmiJ33-AB sólo se obtuvieron 6 clonas, las cuales fueron analizadas por patrón de restricción y sólo una clona fue positiva (Fig. 29). Con respecto a la clonación del SBD se obtuvieron 5 clonas de las cuales sólo una fue positiva (Fig. 30).

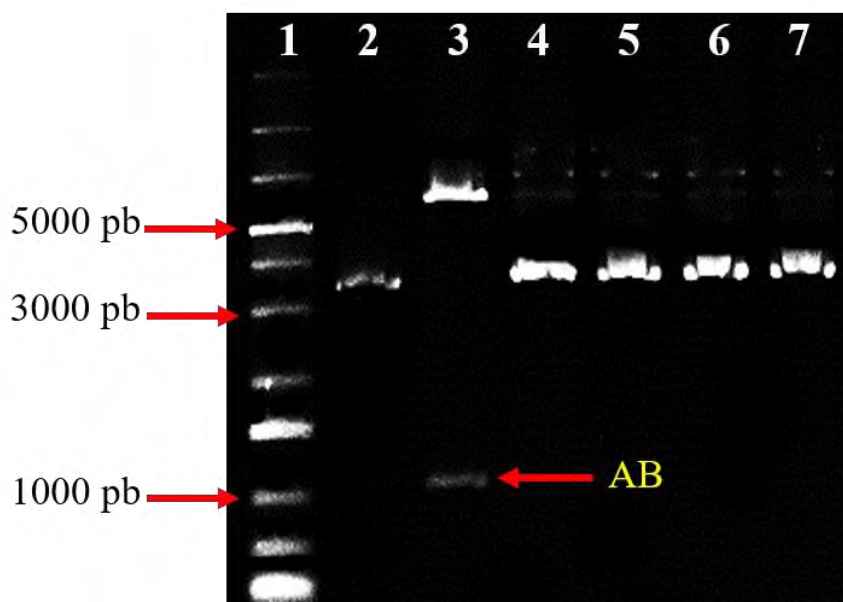


Figura 29. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la versión truncada AmiJ33-AB de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M en pET101D/TOPO. Digestiones de los plásmidos pET101/D-TOPO+AB con las enzimas NdeI y XhoI. 1: marcador de peso molecular. 2-7: digestiones del plásmido AB.

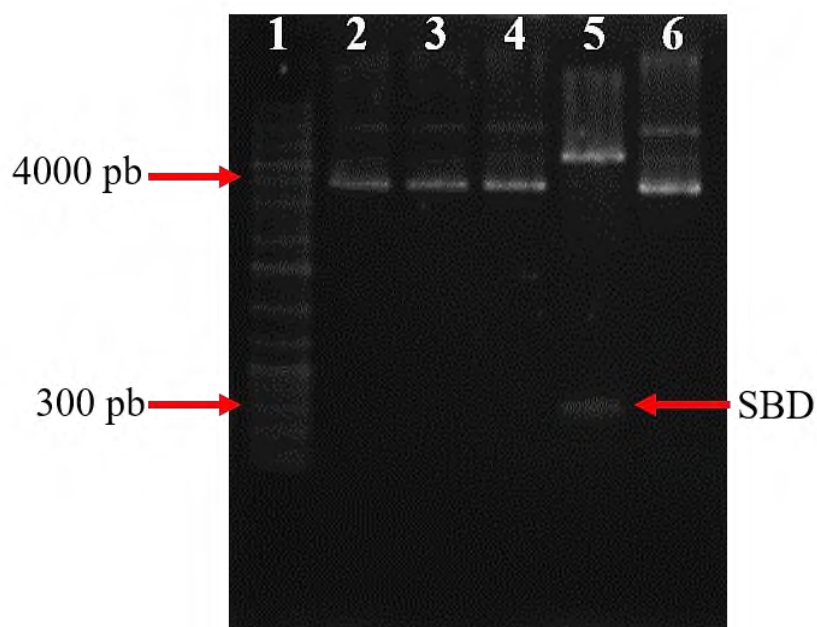


Figura 30. Análisis de las colonias obtenidas de la clonación de la región SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M en pET101D/TOPO. Digestiones de los plásmidos pET101/D-TOPO+SBD con las enzimas NdeI y XhoI. 1: marcador de peso molecular 1 kb. 2-6: plásmido digerido.

6.3.2 Análisis de la secuencia de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-ABC, AmiJ33-AB y el SBD)

AmiJ33-ABCD

La secuencia de la clona AmiJ33-ABCD consiste en una secuencia de 515 aminoácidos con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.85 y un peso molecular calculado de 57 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi). La secuencia que codifica para la α -amilasa, AmiJ33-ABCD fue analizada por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y traducida por el software ExPASy Tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) esta secuencia revela que AmiJ33-ABCD tiene una identidad del 100% con la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M y una identidad entre el 96-99% con α -amilasas del género *Bacillus*. El ORF (marco de lectura abierto) se confirmó con el programa ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html). El parche de histidinas (marcada en

verde) es el componente del pET101D/TOPO. La secuencia de la construcción se muestra enseguida (Fig. 31).

Secuencia pET22b

```

tttggtttaactttaagaaggagatatatacatatggtgaccgcatcttcagtcacaaagcgga 60
M V T A S S V K S G
accatccttcatgcctggaattggtcattcaatacgttaacacacaaaatatgaaagatatatt 120
T I L H A W N W S F N T L T Q N M K D I
cgtgatgcaggctatgcagccattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaagggaaac 180
R D A G Y A A I Q T S P I N Q V K E G N
caaggagataagagcatgaggaattggtactggctgtatcagccgacatcgtaccaaattc 240
Q G D K S M R N W Y W L Y Q P T S Y Q I
ggcaaccgttacttaggaactgaacaagagtttaaggacatgtgcgagccgcagaaaaa 300
G N R Y L G T E Q E F K D M C A A A E K
tatggcgtaaaagtcattgtcgatgcggtcatcaatcatacgaccagtgattatagcgcg 360
Y G V K V I V D A V I N H T T S D Y S A
atctctgacgagattaagcgtattccaaactggacccatggaaacacacaaaattaaaaat 420
I S D E I K R I P N W T H G N T Q I K N
tggtcggacagatgggatgtcactcaaaattcactattggggctgtatgattggaatact 480
W S D R W D V T Q N S L L G L Y D W N T
caaaatactgaggtgcaaaccctatctgaaacgcttcttggaagagcattgaatgcagga 540
Q N T E V Q T Y L K R F L E R A L N D G
gcgagcggtattccgttatgatgctgccaagcatatagagcttccggatgacgagaattac 600
A D G F R Y D A A K H I E L P D D E N Y
ggcagccgatttttgccgaatatcacaaatacagcgcggaattccaatacggagaaatc 660
G S R F W P N I T N T A A E F Q Y G E I
ctgcaagacagcgcggtccagagatactgcttatgcaattatatgaatgtgacgcgttca 720
L Q D S A S R D T A Y A N Y M N V T A S
aactatggacattccatcaggtccgccttgaagaaccgcaatctgagtgtgtcgaatatt 780
N Y G H S I R S A L K N R N L S V S N I
tcccattatgcatctgatgtgtctgcggaacaaattgggtcacatgggtggaatcacatgat 840
S H Y A S D V S A D K L V T W V E S H D
acgtatgccaatgatgaggaagagtctacatggatgagcgatgacgatatccgttttaggc 900
T Y A N D E E E S T W M S D D D I R L G
tgggcagtgatcggttcccgctcaggaagtacacctcttttcttttccagacctgagggc 960
W A V I G S R S G S T P L F F S R P E G
ggaggaaatggtgtaagatttcccggaacaaagtcaaataggcgatcgcgaggagtgcatta 1020
G G N G V R F P G K S Q I G D R G S A L
tttaaagatcaagcgatcactgcggtcaatatctttcacaaatgtaatgggcgggtcagcct 1080
F K D Q A I T A V N I F H N V M G G Q P
gaggaactctcgaatccgaatgggaacaatcaaatctttatgaatcagcgcggtcaaaa 1140
E E L S N P N G N N Q I F M N Q R G S K
ggcggttgctgctggcaaatgcaggatcgtctgcccgttgccgtcaatacgtcaacgaaatta 1200
G V V L A N A G S S A V A V N T S T K L
cctgacggcaggtatgataatagagccggcatcggttcatttcaagtgcgaacggtaaa 1260
P D G R Y D N R A G I G S F Q V T N G K
ctgacagggcagatcaatgccagatccgttgctgttctttatcctgacgatatcggaat 1320
L T G T I N A R S V A V L Y P D D I G N
gcgccctcatgtcttcccttgagaattatcaaacgggagcagtcattctttcaacgatcag 1380
A P H V F L E N Y Q T G A V H S F N D Q
ctgacgggtcacccctgctgcaaatgcgaaaacaacaaaagccgttttatcaaatcaataat 1440
L T V T L R A N A K T T K A V Y Q I N N
gggcagcagacgggattttaaggacggagaccgattaacgatcggaaaaggagatccaatc 1500
G Q Q T G F K D G D R L T I G K G D P I
ggcacggcatacgacatcaagttaaccggaacgaacagcgagggtgcagcaagaacccaa 1560

```

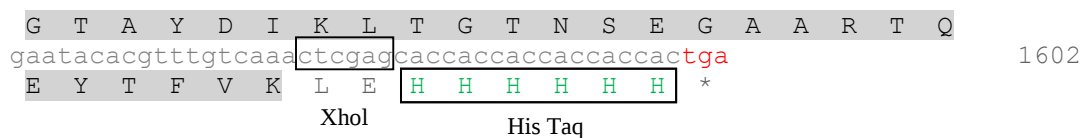


Figura 31. Secuencia y proteína codificante de AmiJ33-ABCD. La secuencia aminoacidica marcada en rojo indica el dominio A, en verde el dominio B, en amarillo el dominio C y en color gris el dominio D.

AmiJ33-ABC

Como se ha mencionado, el inserto ABC se amplificó del ADN_g de *B. amyloliquefaciens* JJC33M utilizando los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 5) y se clonó en pJET (vector de extremos romos), posteriormente el inserto clonado se digirió y se subclonó en el vector de expresión pET22b, dando lugar a la construcción pET22b+ABC. Dicha construcción se secuenció. La secuencia indica que el gen no se clonó correctamente, ya que el ORF codifica para un péptido de 9 aa. En el inicio de la secuencia se localizaron 24 nucleótidos de origen desconocido (marcados en verde), y 130 nucleótidos río abajo se encontró un fragmento de la secuencia del dominio A de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, pero en el marco de lectura +1, por lo que se encuentra desfasado. Es posible que el error de clonación se arrastre desde la amplificación y se vea reflejado en la clonación en pJET. La secuencia y la proteína codificante se muestran en la fig. 32.



```

ttggaaagagcattgaatgacggagcggacggattccgttatgatgctgccaagcatata 540
gagcttccggatgacgggaattacggcagccgattttggccgaatatcacaatacagcg 600
gcggaattccaatacggagaaaatcctgcaagacagcgcgctgcagagatactgcttatgcg 660
aattatatgaatgtgaccgcttcaaactatggacattccatcagggtccgccttgaagaac 720
cgcaatctgagtgtgtcgaatatattccattatgcatctgatgtgtctgctgaggacaaattg 780
gtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgccaatgatgaggaagagtctacatggatg 840
agcgatgacgatatccgtttaggctgggcagtgatcgggtcccgctcaggaagtacacct 900
cttttcttttccagacctgagggcggaggaaatgggtgtaagatttcccggaataaagtcaa 960
ataggcgatcgcgggagtgacattatttaagatcaagcgatcactgcggtcaatatcttt 1020
cacaatgtaatgggcgggtcagcctgaggaactctcgaatccgaatgggaacaatcaaatac 1080
tttatgaatcagcgcggtcctcaaaaggcggtgtgtctggcaaatgcaggatcgtctgccgtt 1140
gccgtcaatacgtcaacgaaattacctgacggcaggtatgataatagagccggcatcggt 1200
tcatttcaagtgaacgaacggtaaaactgacaggcacgatcaatgccagatccgttgctgtt 1260
ctttatcctgacgatatcggaatgcggtcgagatcttgctgaaaaactcgagcaccacc 1320
accaccaccactgagatccggctgc 1345

```

Figura 32. Secuencia y segmento codificante de la clona ABC. El atg está marcado en color rojo y en color verde está marcada la secuencia de 24 nucleótidos desconocidos.

AmiJ33-AB

La secuencia de la clona AmiJ33-AB consiste en una secuencia de 347 aminoácidos con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.40 y un peso molecular calculado de 30 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi). La secuencia que codifica para la α -amilasa, AmiJ33-AB fue analizada por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y traducida por el software ExPASy Tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) ésta secuencia tiene una identidad del 100% con la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M y una identidad entre el 96-99% con α -amilasas del género *Bacillus*. El ORF se confirmó con el programa ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) y como resultado se observó que la secuencia que codifica para la amilasa AmiJ33-AB está en el marco correcto de lectura. El

gen de la clona AmiJ33-AB y la proteína codificante (dominio A/B) se muestran en la figura 33.



Figura 33. Secuencia y proteína codificante de AmiJ33-AB. La secuencia aminoacídica marcada en rojo indica el dominio A, en verde el dominio B, los nucleótidos encerrados indican la secuencia que reconoce a la enzima XhoI (se utilizó para identificar el inserto de interés).

Región putativa SBD

La secuencia de la región putativa tipo SBD consiste en una secuencia de 103 aminoácidos con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 7.2 y un peso molecular calculado de 13 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi). El análisis de la secuencia aminoacídica revela que el SBD se clonó correctamente y para corroborar se utilizó el software ORF Finder el cuál indicó que la secuencia que codifica para el SBD se encuentra en el marco correcto de lectura. La secuencia aminoacídica del SBD fue analizada por BLAST y traducida por el software ExPASy Tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) esta secuencia tiene una identidad del 100% con la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, *B. siamensis* y *Bacillus sp.* JFL15. Además el resultado del BLAST identifica a esta secuencia (SBD) dentro de la familia CBM26. La secuencia aminoacídica (marcada en verde) son los componentes del plásmido pET101D/TOPO. El gen de la región putativa tipo SBD (dominio E) y la proteína codificante se muestran en la figura 34.

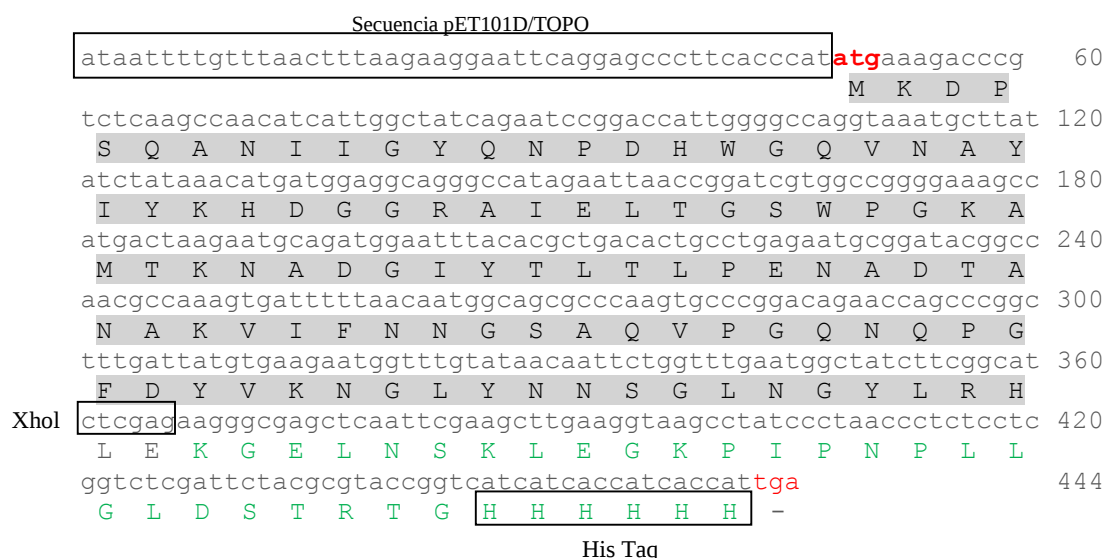


Figura 34. Secuencia y proteína codificante del SBD. La secuencia marcada en color gris indica la región SBD y la secuencia marcada en color verde indica la región del plásmido pET101D/TOPO.

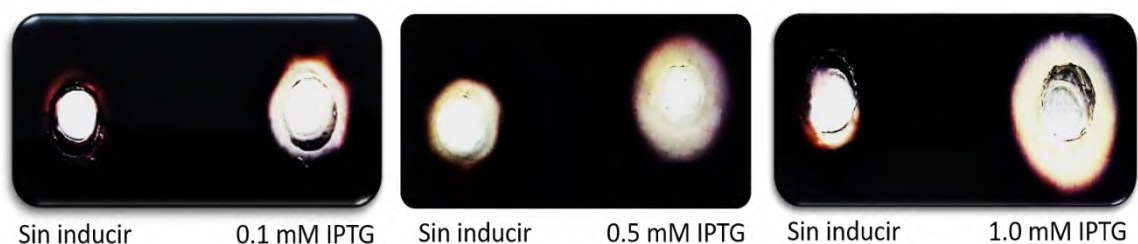
6.4 Ensayo de actividad en cajas Petri de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

Las construcciones de las versiones truncadas que incluyen el dominio catalítico de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M y que están correctamente clonadas (AmiJ33-ABCD, AmiJ33-AB), fueron inducidas con diversas concentraciones de IPTG (0.1, 0.5 y 1.0 mM) y los extractos enzimáticos fueron analizados por actividad en caja Petri con almidón gelatinizado 10 g/L (Fig. 35). En la figura 35 y 36 se observa que solo la clona AmiJ33-ABCD mostró actividad, la enzima se localiza intracelular y extracelularmente (en el sobrenadante), lo cual indica que AmiJ33-ABCD se exporta al medio extracelular a través de la membrana celular de *E. coli*. Se ha reportado que en algunos casos la composición del medio de cultivo también es un factor de gran interés, ya que los componentes del medio pueden afectar la producción basal de proteína recombinante, generar alta producción bajo condiciones no inducidas o provocar liberación de la proteína al medio extracelular (Grossman *et al.*, 1998; Jevsevar *et al.*, 2007). Sin embargo, esto no está pasando con AmiJ33-ABCD, porque si la composición del medio de cultivo influyera en la secreción de la proteína, también se vería afectada la secreción de la clona AmiJ33-AB. Por otro lado, en trabajos reportados para la α -amilasa TS-23 de *B. subtilis* (Lo Fen *et al.*, 2001) se menciona que a pesar de la eliminación de la región N-terminal (péptido señal) la proteína se localizó en el periplasma, lo que indica que la proteína truncada puede contener una secuencia señal-ancra interna para la translocación de la proteína.

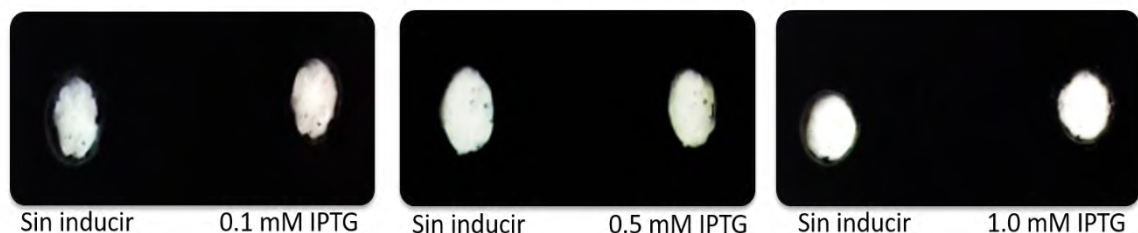
En cuanto a la concentración de IPTG (0.1, 0.5 y 1.0 mM), el efecto se evaluó a través de la medición de la relación diámetro del halo (DH): diámetro de la colonia (DC) (Fig. 37). Se observó que existe diferencia significativa entre la concentración 0.1 mM y 0.5 mM (DH/DC 2.6 y 3, respectivamente). Sin embargo, entre 0.5 y 1 mM IPTG no hay diferencia significativa con relación DH: DC (2.9 y 3.0, respectivamente) (Fig. 37). Por otro lado, el extracto de *E. coli* BL21-ABCD sin IPTG y *E. coli* BL21 son estadísticamente diferentes en comparación con las clonas inducidas con IPTG, esto se debe a que la clona ABCD está en el plásmido pET22b y contiene el *operon lac* el cual es inducible por un análogo a la lactosa, el IPTG, y permite la expresión de proteínas donde el gen está bajo su control. En conclusión, AmiJ33-ABCD alcanza su máxima expresión utilizando 0.5 mM de IPTG a 37°C de incubación y en 8 h después de la inducción (Figs. 35 y 36). En contraste, AmiJ33r alcanza

su máxima expresión con 0.2% de arabinosa a 37°C y en 4 h después de la inducción. Se sabe que la expresión de las proteínas recombinantes es multifactorial y deben realizarse pruebas para determinar el tiempo, la concentración y la temperatura de expresión (Peng *et al.*, 2014; Ghasemi *et al.*, 2015; Kanpiengjai *et al.*, 2017). Por lo que en este caso las mejores condiciones de expresión fueron las ya mencionadas.

A). Muestras recolectadas del sobrenadante de la inducción de AmiJ33-ABCD



B). Muestras recolectadas del sobrenadante de la inducción de AmiJ33-ABC



C). Muestras recolectadas del sobrenadante de la inducción de AmiJ33-AB



Figura 35. Muestras recolectadas del sobrenadante de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M inducidas con IPTG. Pruebas realizadas en cajas Petri con almidón 10 g/L.

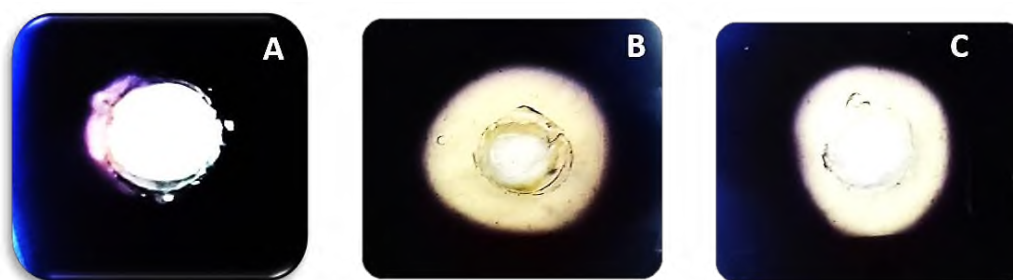


Figura 36. Prueba de actividad de AmiJ33-ABCD (0.5mM IPTG) en caja Petri con almidón 10 g/L. A). Pellet de *E. coli* BL21 sin plásmido. B). Sobrenadante AmiJ33-ABCD. C). Pellet lisado AmiJ33-ABCD.

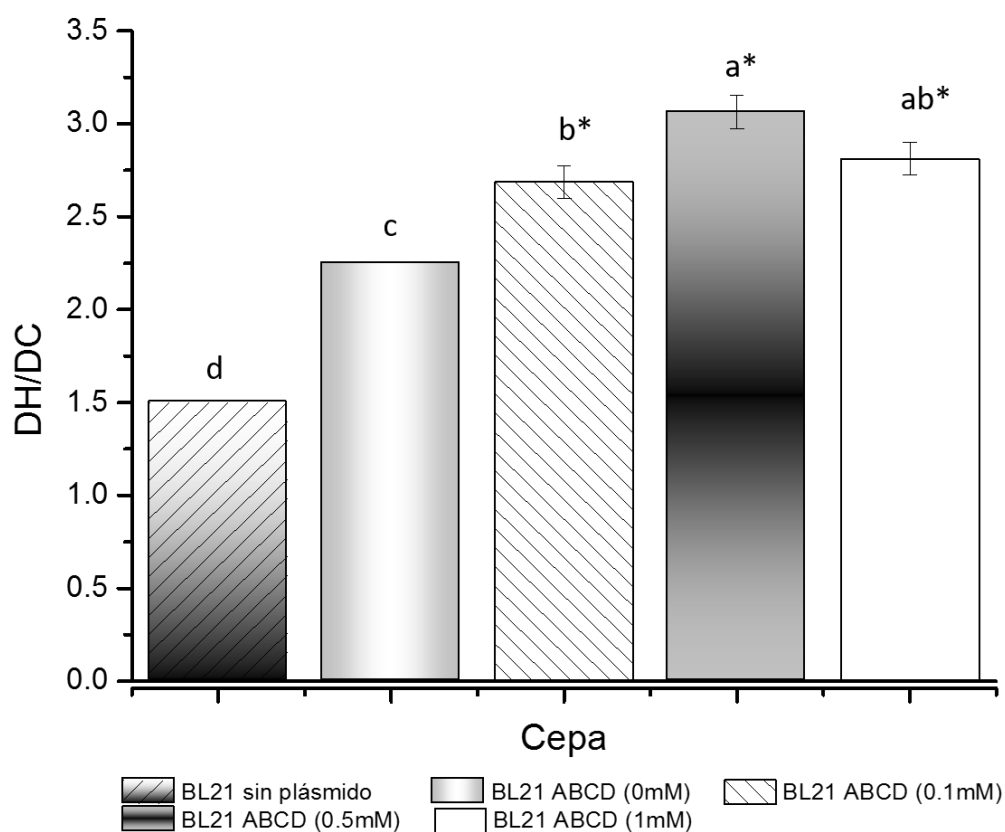


Figura 37. Efecto de la concentración del inductor IPTG sobre la actividad α -amilasa (AmiJ33-ABCD) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Las diferencias significativas fueron evaluadas por el software Minitab 16 Statistical. Tukey, $p \geq 0.05$, $n=2$.

La clona AmiJ33-ABC no mostró actividad y en geles SDS-PAGE se observaron péptidos, lo cual corroboró que dicha enzima no tuviera actividad enzimática y no se expresara con base en su peso molecular esperado (datos no mostrados).

La clona AmiJ33-AB no mostró actividad. Sin embargo, la proteína se rastreó mediante geles SDS-PAGE que se detallan a continuación.

6.5 Purificación de las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

AmiJ33-ABCD mostró actividad en el sobrenadante y en el espacio periplásmico, además cuando se analizó la sobreexpresión de la proteína por medio de geles de SDS-PAGE 10%, se observó sobreexpresión en ambos compartimentos (datos no mostrados). AmiJ33-AB se obtuvo de la lisis celular mediante el reactivo Bugbuster 1X. Posteriormente, las versiones truncadas (AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB) se purificaron por cromatografía de afinidad con la resina de Ni-NTA (QIAGEN®), las eluciones con mayor actividad se mezclaron. La proteína total obtenida para AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB fue de 0.79 y 0.26 mg/mL, respectivamente. El peso molecular calculado a partir de la secuencia aminoacídica *in silico* de AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB es de 57 y 35 kDa. Sin embargo, los componentes (aminoácidos y el parche de histidina) de los plásmidos utilizados (pET22b(+)) y el pET101D/TOPO) para la clonación y expresión de las versiones truncadas incrementan el peso molecular de entre 1 y 3 kDa. Con el incremento del peso molecular, las versiones truncadas AmiJ33-ABCD y AmiJ33-AB mostraron un peso molecular aproximado de 58 y 35 kDa, respectivamente (Figs. 39 y 40). En el caso de la versión AmiJ33-ABCD, en el zimograma se observa una banda de actividad que corresponde con el tamaño de la proteína, sin embargo en el caso de la versión AmiJ33-AB no se observó dicha banda, indicando que la proteína se expresa pero no es activa (Figs. 39 y 40). Esto indica que la región C-terminal es necesario para que la enzima sea activa. Sin embargo, no se determinó si la eliminación del dominio C afecta el plegamiento parcial o totalmente, para ello se requerirían experimentos que señalen el nivel de plegamiento de la proteína. En trabajos reportados para la α -amilasa (AmyP Δ SBD) de la subfamilia GH37 (Liu *et al.*, 2017) se menciona que el dominio B presente en dicha α -amilasa está conformado por 28 aa lo que conlleva a que este dominio B sea el más pequeño en las α -amilasas GH13 actualmente conocidas. Otras de las

características que Liu *et al.*, 2017 mencionan es que este dominio B por ser pequeño no interfiere en el sitio catalítico y contribuye a la termoestabilidad y actividad de dicha enzima. Sin embargo, al observar la estructura 3D de la α -amilasa (AmiJ33-AB) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, el dominio B es 22 aa más grande que el dominio B de AmyPASBD esto podría ocasionar una cubierta estructural por encima del sitio activo (Dominio A) y probablemente restringe el acceso al sustrato. Por otro lado, Van der Maarel *et al.*, 2002 menciona que el dominio C es crucial para la actividad enzimática ya que dicho dominio es fundamental para que la enzima sea estable. La eliminación del dominio C en AmiJ33-AB y la estructura alargada del dominio B en dicha proteína podrían estar afectando la estabilidad de la enzima y por ende la actividad enzimática (Fig. 38). Sin embargo, como se mencionó anteriormente se requerirían realizar experimentos (dicroísmo circular y fluorescencia) a nivel estructural para observar el nivel de plegamiento.



Figura 38. Estructura 3D de AmiJ33-AB. La estructura de color rojo representa el dominio A y la de color verde, el dominio B.

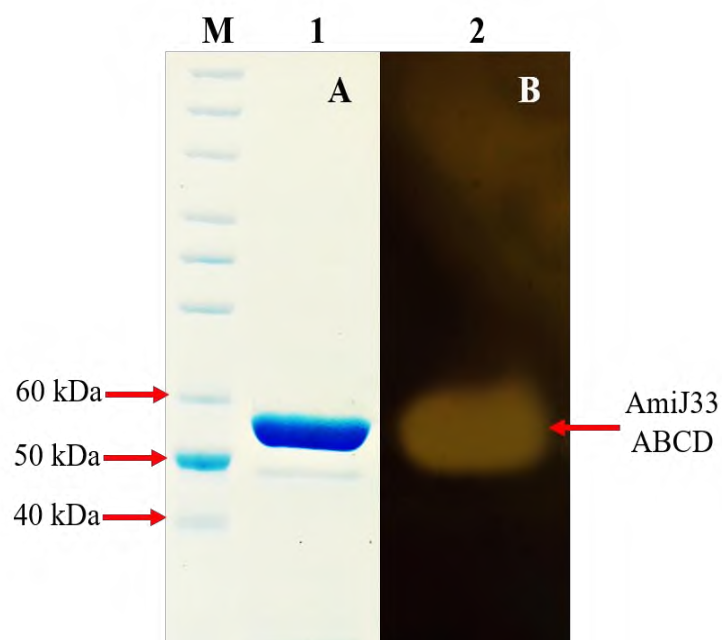


Figura 39. Zimograma de la versión truncada (AmiJ33-ABCD) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A). Tinción con azul de Coomasie. B). Zimograma, teñido con lugol. M: marcador de molecular (PageRuler Unstained Protein Lad). 1 y 2: AmiJ33-ABCD.

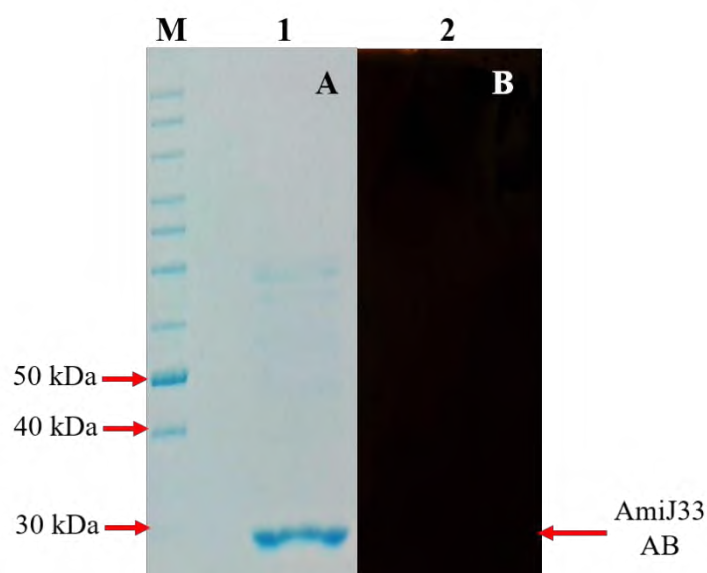


Figura 40. Zimograma de la versión truncada (AmiJ33-AB) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A). Tinción con azul de Coomasie. B). Zimograma, teñido con lugol. M: marcador de molecular (PageRuler Unstained Protein Lad). 1 y 2: AmiJ33-AB.

6.6 Caracterización bioquímica de la clona con actividad enzimática, AmiJ33-ABCD

6.6.1 Efecto de pH sobre la actividad y estabilidad de AmiJ33-ABCD

En este trabajo se evaluó la hidrólisis de AmiJ33-ABCD, esta enzima sólo hidrolizó almidón gelatinizado y no almidón nativo, por tal motivo todas las pruebas experimentales se realizaron utilizando como sustrato almidón gelatinizado.

El efecto de pH sobre la actividad de AmiJ33-ABCD se determinó en un intervalo de pH 3.0 a 9.0, a 45°C. A pH de 8.0 se observó la mayor actividad (100%) de AmiJ33-ABCD (Fig. 41). A pH 3.0 AmiJ33-ABCD mostró el 84% de actividad, mientras que a pH's: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 9.0, AmiJ33-ABCD mostró el 66, 68, 75, 87 y 51% de su actividad, respectivamente.

AmiJ33r (proteína completa, con todos los dominios, Fig. 22) presenta la mayor actividad a pH 9.0 (alcalino) mientras tanto la α -amilasa nativa (AmiJ33) presenta su mayor actividad a pH 5.0 ácido (Montor-Antonio *et al.*, 2017) y la α -amilasa (AmiJ33-ABCD) presenta su mayor actividad a pH 8.0 (Fig. 41), lo cual indica que la eliminación del dominio E (SBD) influyó en la actividad a pHs alcalinos, es decir, tal y como se menciona en la literatura, el efecto del pH depende de la secuencia de aminoácidos que conforman las enzimas (www.laguna.fmedic.unam.mx). El pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y cuando varía, como es el caso de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, la conformación de la enzima se altera, produciéndose un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo y como resultado puede o no ser funcional. Esto es debido a que la conformación de una proteína depende también, de las atracciones y repulsiones entre los aminoácidos cargados negativamente y positivamente (Lehninger *et al.*, 2006).

En cuanto a la comparación con otras α -amilasas, se observó que los resultados concuerdan con la α -amilasa de *Bacillus sp.* (Asgher *et al.*, 2006) que presenta su mayor actividad a pH 8.0. Sin embargo, la α -amilasa *Bacillus sp.* BCC 01-50 (Simair *et al.*, 2017) mantiene a pH 7.0 un 80-82 % de su actividad, por otro lado, a pH 8.0 sólo presenta alrededor del 90 % de actividad. Otras α -amilasas como la α -amilasa *B. subtilis* KIBGE HAS (Bano *et*

al., 2011) presenta su máxima actividad a pH 7.5. Mientras que las α -amilasas de *Bacillus* sp. BK20 (Kubrak *et al.*, 2010), *Bacillus* sp (Teodoro *et al.*, 2000) presentan su mayor actividad a pH entre 6.0 y 8.0. Cabe resaltar que AmiJ33-ABCD a pH 3.0 mantiene el 84 % de su actividad y muy pocas α -amilasas presentan actividad a pHs ácidos por el contrario la mayoría de estas presentan actividad a pHs alcalinos entre 6-8.0 como se mencionó anteriormente. Por lo que su pH de acción podría encontrarse a pH 3 y 8.

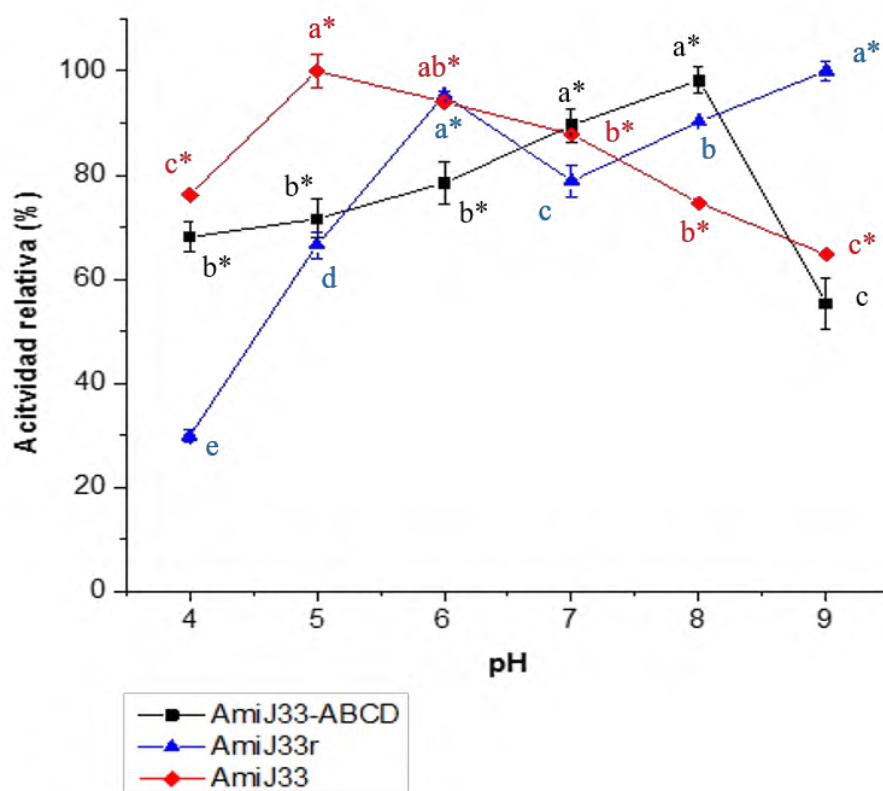


Figura 41. Efecto de pH sobre la actividad de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*). Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$. *Datos tomados de Montor-Antonio *et al.*, 2017.

6.6.2 Efecto del pH en la estabilidad de AmiJ33-ABCD

En cuanto a la estabilidad en diferentes pHs, AmiJ33-ABCD mostró ser estable a pH 7.0 y pH 8.0 después de 24 h con el 100% y 99% de actividad relativa, respectivamente. A pHs ácidos como 3.0 mantiene entre el 55% de su actividad, aunque a pH 5.0 mostró el 80% y a pH 9.0 mantuvo el 68% de actividad (Fig. 42). Mientras que la versión completa y la nativa de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r y AmiJ33) mantienen su estabilidad a pH 5.0 (100%) por 24 h (Montor-Antonio *et al.*, 2017), AmiJ33-ABCD a pH 5.0 sólo mantiene el 80% de su actividad (Fig. 42). AmiJ33-ABCD es estable a pHs alcalinos entre 7 y 8.0, en cambio AmiJ33r solo presenta el 70% de actividad residual. En este caso, la eliminación del dominio E mejoró la estabilidad a pHs alcalinos a diferencia de la versión completa (AmiJ33r), así mismo. Es posible que la existencia de esas regiones extras; dominio D en el caso de AmiJ33-ABCD y dominio D y E en el caso de AmiJ33r, sirvan como amortiguadores de pH y proporcionen estabilidad a pHs alcalinos.

Al comparar con otras α -amilasas reportadas, observamos que la α -amilasa alcalófila recombinante N-Amy703, tiene una estructura modular similar a AmiJ33-ABCD con dominios A/B, C y la región C-terminal, es estable (100%) a pHs alcalinos (8.5) después de 12 h (Zhenghui Lu *et al.*, 2017). Otro comportamiento similar es el de la α -amilasa de *B. subtilis*, AmyQ A (enzima nativa) y AmyQ B (enzima recombinante), que son estables a pHs ligeramente ácidos (pH 5.5) y pHs alcalinos (7.0-8.0), respectivamente (Yang *et al.*, 2012). Cabe mencionar que AmyQ A y AmyQ B son estructuralmente iguales.

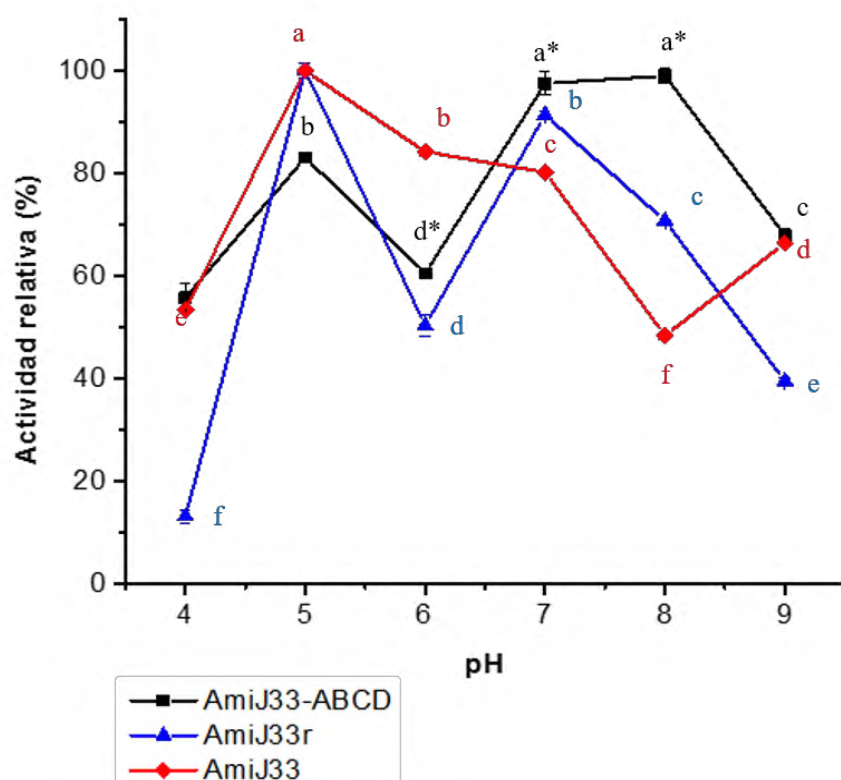


Figura 42. Efecto de pH en la estabilidad de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*). Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$. *Datos tomados de Montor-Antonio *et al.*, 2017.

6.6.3 Efecto de la temperatura y termoestabilidad en la actividad de AmiJ33-ABCD

El efecto de la temperatura se evaluó de 40 a 90°C (Fig. 43). AmiJ33-ABCD mostró su máxima actividad a 80°C, mientras que de 40 a 70°C mantuvo sólo el 32, 51, 62 y 72% de su actividad. A 90°C, AmiJ33-ABCD sólo mostró el 75% de su actividad residual. La α -amilasa nativa AmiJ33 (dominio A/B y C) y recombinante AmiJ33r (dominio A/B, C, D y E) presentaron su mayor actividad a 80°C (Montor-Antonio *et al.*, 2017), al igual que la versión truncada AmiJ33-ABCD. El comportamiento del efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33 (nativa) es el mismo, lo cual sugiere que la región extra C-terminal (Dominio D y E) no tiene efecto significativo en la temperatura óptima de la enzima, algo también observado en otras α -amilasas (Salimi *et al.*, 2012). Estos

resultados son similares a lo reportado para la α -amilasa de *B. subtilis* (Asgher *et al.*, 2006) que presenta su mayor actividad a temperatura óptima de 80°C. Por otro lado, la α -amilasa de *B. licheniformis* CUMC305 (Vaseekaran *et al.*, 2010) presenta su mayor actividad entre 80 y 90°C, mientras que las α -amilasas de *B. subtilis* (Teodoro and Martins, 2000), *Bacillus sp.* (Arikan, 2007), *Bacillus sp.* BBM1 (Moreno *et al.*, 2010) presentan su máxima actividad entre 40 y 80°C.

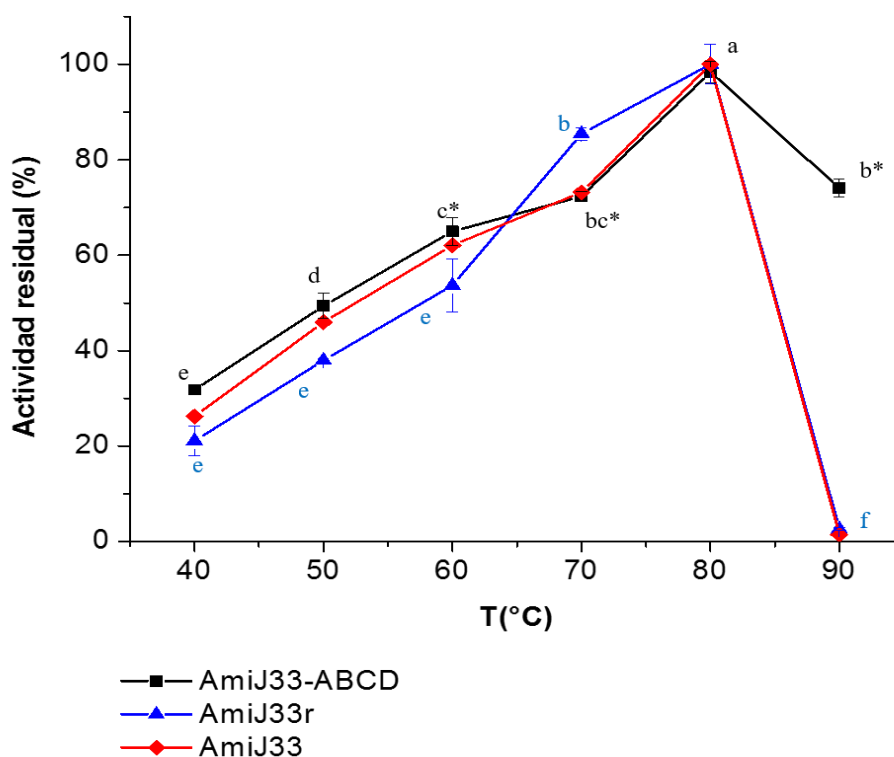


Figura 43. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*). Condiciones del experimento; temperaturas evaluadas 40-90°C, como sustrato almidón gelatinizado. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$. *Datos tomados de Montor-Antonio *et al.*, 2017.

En cuanto a la termoestabilidad, la actividad de AmiJ33-ABCD a 40°C se mantuvo por 30 minutos; para posteriormente (60 minutos) disminuir al 67%. A los 50°C, la actividad de AmiJ33-ABCD disminuyó 30% y se mantuvo por 30 minutos, sin embargo, a los 60 minutos sólo mantuvo el 40% de su actividad. Finalmente, a los 60°C, AmiJ33-ABCD no presentó actividad enzimática en el tiempo evaluado (30 y 60 minutos). Por otro lado, no se evaluó la termoestabilidad de AmiJ33-ABCD a 70, 80 y 90°C ya que como se mencionó anteriormente, a 60°C AmiJ33-ABCD no presentó actividad, lo que nos permitió predecir que a esas temperaturas AmiJ33-ABCD se desnaturalizará (Fig. 44).

La α -amilasa nativa (AmiJ33) y recombinante (AmiJ33r) presentaron un perfil similar de termoestabilidad en comparación con el de AmiJ33-ABCD (Fig. 44). Sin embargo, el valor de vida media para cada temperatura y enzima es diferente. El dominio E (SBD) influyó en la termoestabilidad de la enzima nativa en comparación con la enzima recombinante que tiene una vida media 13.5 veces mayor que la versión truncada AmiJ33-ABCD (dominio A/B, C y D) de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Tabla 13), AmiJ33-ABCD tiene una vida media 8.5 veces menor que AmiJ33 (Tabla 13). En trabajos reportados, se menciona que una de las ventajas del SBD aparte de su función para hidrolizar el almidón nativo es dar termoestabilidad a las enzimas, principalmente α -amilasas (Janecek and Secvik, 1999) como es el caso para la α -amilasa de *B. pseudofirmus* (Zhenghui Lu *et al.*, 2014; Zhenghui Lu *et al.*, 2017) que al eliminar el SBD aumentó cerca del 30, 70 y 70% en la termoestabilidad a temperaturas de 40, 45 y 50°C, respectivamente.

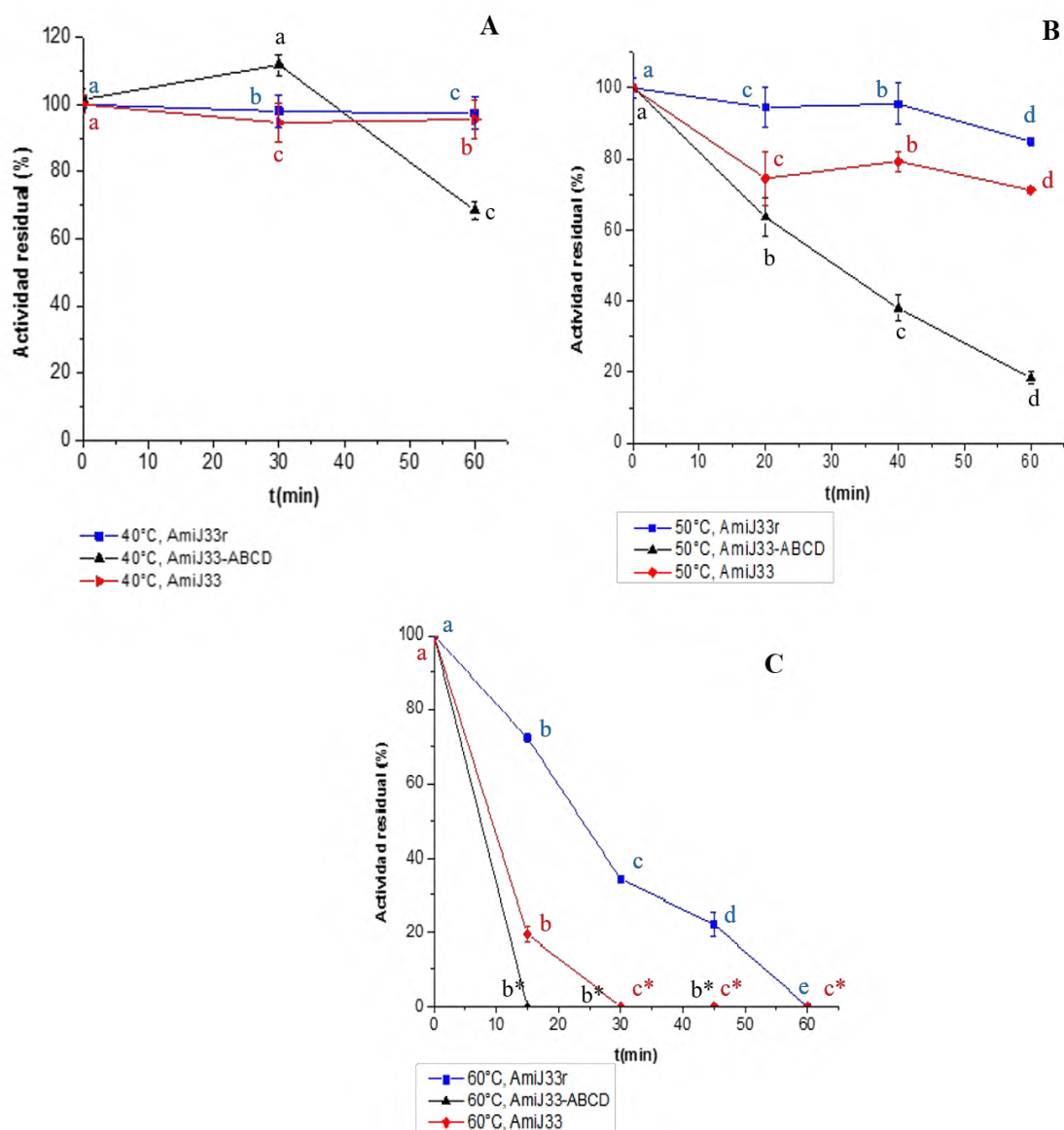


Figura 44. Termoestabilidad sobre la actividad de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (A). 40°C, AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33. B). 50°C, AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*. C). 60°C, AmiJ33r*, AmiJ33-ABCD y AmiJ33*). Condiciones del experimento; temperaturas evaluadas 40, 50 y 60°C, como sustrato almidón gelatinizado. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$. Las diferencias significativas fueron evaluadas comparando las tres temperaturas 40, 50 y 60°C. *Datos tomados de Montor-Antonio *et al.*, 2017.

Tabla 13. Vida media de la α -amilasa AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33 de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

Clona	Vida media			Referencia
	40°C	50°C	60°C	
Recombinante (AmiJ33r)	23h	4.4h	40min	Montor-Antonio <i>et al.</i> , 2017
AmiJ33-ABCD	1.75h	24min	15min	Este trabajo
Nativa	14.43h	2.68h	9min	Montor-Antonio <i>et al.</i> , 2017

6.6.4 Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33-ABCD

Para determinar el efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33-ABCD se utilizaron diferentes concentraciones de almidón (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mg/mL) y con ello se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . La cinética de AmiJ33-ABCD se ajustó al modelo de Michaelis-Menten y los valores de K_m y V_{max} que fueron 330.16 U/mg y 1.6 mg/mL (Fig. 45), respectivamente. AmiJ33r y la α -amilasa nativa, también se ajustan al modelo de Michaelis-Menten (Montor-Antonio *et al.*, 2017), además AmiJ33r y AmiJ33-ABCD presentaron valores de V_{max} bajos, aunque AmiJ33-ABCD es más afín al sustrato, los resultados de las V_{max} indican que son estadísticamente diferentes, lo que genera que la enzima sea 2 veces más eficiente que AmiJ33r (Tabla 14).

En cuanto a la comparación de AmiJ33-ABCD con AmiJ33 nativa, AmiJ33-ABCD es 3 veces menos rápida, aunque es 1.5 veces más afín al sustrato, lo que provoca que sea 3 veces menos eficiente que AmiJ33 (Tabla 14). Por lo tanto, la eliminación del SBD (dominio E) generó una enzima con mayor afinidad por el sustrato, lo cual indica que el SBD puede estar obstruyendo el acceso del sustrato.

En la literatura se reportó que la eliminación del SBD de una α -amilasa obtenida de un banco metagenómico bacteriano marino (AmyP) provocó que la enzima disminuyera su eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) sobre almidón nativo y gelatinizado, es decir la eliminación del SBD en AmyP generó una enzima 4.3 y 2.3 veces menos eficiente en la degradación de almidón gelatinizado y nativo, respectivamente (Peng *et al.*, 2014). En cambio, en el presente

caso de estudio, la eliminación del SBD generó una enzima con mayor eficiencia catalítica. Peng *et al.*, 2014, también menciona que el SBD puede jugar un papel importante en la hidrólisis del almidón soluble, caso contrario al de AmiJ33r. Cinéticamente, la presencia del SBD no favorece la hidrólisis del almidón en AmiJ33.

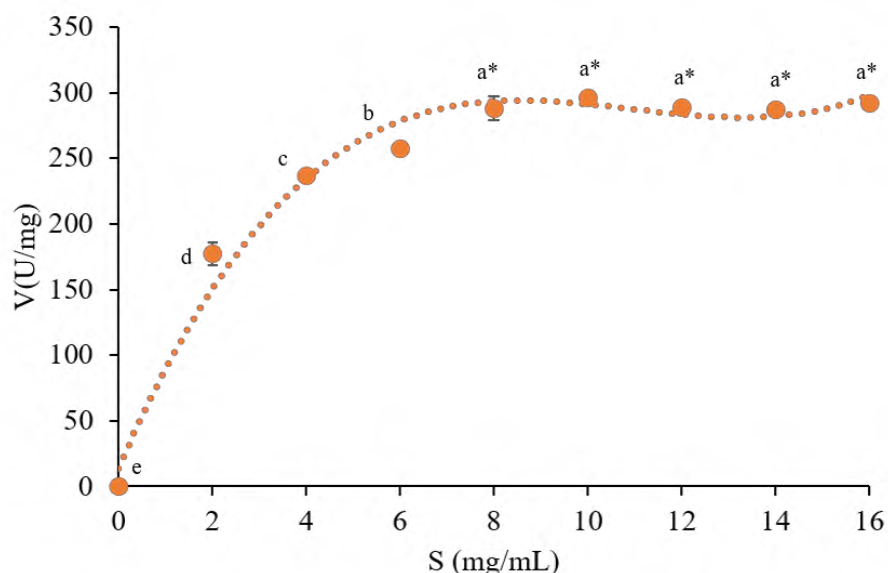


Figura 45. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33-ABCD de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Condiciones del experimento; 45°C, como sustrato almidón gelatinizado (10 g/L), 1.5 U de AmiJ33-ABCD. Tukey, $p > 0.05$, $n = 2$.

Tabla 14. Efecto del SBD de AmiJ33r de *B. amyloliquefaciens* JJC33M y otras α -amilasas con estructuras similares

Clona	V_{max} (U/mg)	K_m (mg/mL)	K_{cat}/K_m $(\frac{1}{s})/(\frac{mg}{mL})$	Referencia
Recombinante (AmiJ33r)	294.11	3.23	135.5	Montor-Antonio <i>et al.</i> , 2017
AmiJ33-ABCD	330	1.6	314.2	Trabajo actual
Nativa	5743	5.0	949.6	Montor-Antonio <i>et al.</i> , 2017
AmyP	453.5	2.5	0.61	Peng <i>et al.</i> , 2014
AmyPΔSBD	103.2	2.9	0.14	

6.6.5 Hidrólisis enzimática del almidón comercial y productos de reacción empleando a AmiJ33-ABCD

Después de determinar las condiciones óptimas de operación de AmiJ33-ABCD se analizó su comportamiento en almidón gelatinizado de papa (10g/L, Eslab) ya que AmiJ33-ABCD no hidroliza almidón nativo (Hernández-Heredia *et al.*, 2017, congreso SMBB). Se cuantificaron los productos de hidrólisis generados durante 120 min y se observó que durante los primeros 30 min, se produjeron 3.2 g/L de azúcares reductores. De los 30 min hasta los 80 min se alcanzaron 4.3 g/L, finalmente entre los 90-120 min la producción de azúcares fue constante entre 4.3-4.5 g/L, alcanzando la máxima producción de azúcares reductores a los 90 min con un total de 4.5 g/L (Fig. 46), posterior a los 90 min la concentración de azúcares reductores prácticamente se mantuvo constante. Lo anterior indica que las productividades alcanzadas a los 30, 80 y 90 min fueron 6.4 g/Lh, 3.3 g/Lh y 3 g/Lh, respectivamente.

En cuanto a la comparación de AmiJ33 (nativa) con AmiJ33-ABCD se obtuvo un perfil similar en la producción de azúcares reductores pues ambas enzimas alcanzan la máxima producción de azúcares entre 4.1 y 4.3 g/L a los 120 minutos (Fig. 46).

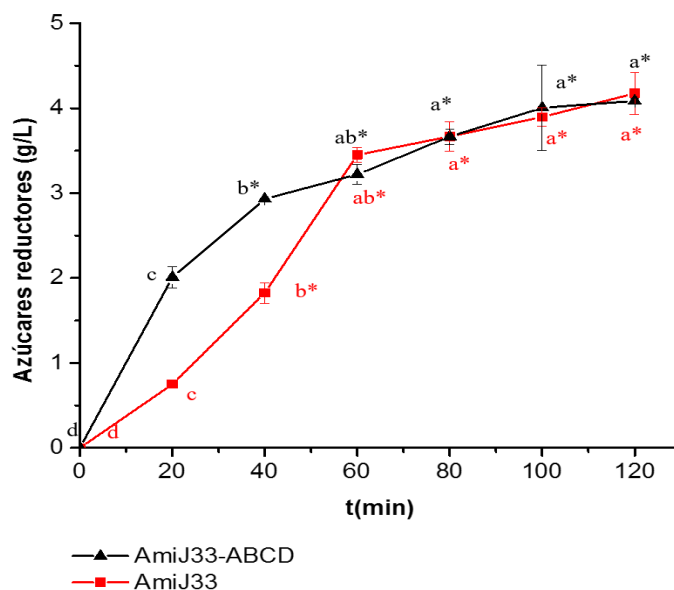


Figura 46. Comparación del comportamiento de la producción de azúcares reductores empleando la α -amilasa (AmiJ3-ABCD y AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. Condiciones experimentales; 45°C, como sustrato almidón gelatinizado (10 g/L). Tukey, $p>0.05$. AmiJ33-ABCD 1.5 U/mL y AmiJ33 1.6 U/mL.

Durante la cinética, se identificaron los productos de hidrólisis del almidón generados con AmiJ33-ABCD que fueron glucosa (GP1), maltosa (GP2), maltotriosa (GP3) y maltotetraosa (GP4) y predominaron la maltosa y la maltotriosa (Fig. 47). Durante los primeros 10-80 min de hidrólisis, se observó glucosa (GP1), maltosa (GP2), maltotriosa (GP3) y maltotetraosa (GP4), aunque en mayor concentración maltosa (GP2), maltotriosa (GP3) y maltotetraosa, lo que se correlaciona con la alta producción de azúcares reductores (2-4.3 g/L) (Fig. 46) en comparación con los tiempos 90-120 min. Después de los 90-120 min la maltotetraosa (GP4) dejó de producirse y solo se produjeron maltotriosa (GP3), maltosa (GP2) y se incrementó la concentración de glucosa (GP1) (Fig. 47). Es decir, al final de la reacción, se observó principalmente la presencia de glucosa (GP1), maltosa (GP2) y maltotriosa (GP3). Es posible que la maltotetraosa (GP4) formada al inicio de la reacción, al final de la reacción se hidrolizó por la enzima hasta la formación de glucosa (GP1) y maltotriosa (GP3).

Al comparar a los productos de hidrólisis de la α -amilasa nativa AmiJ33 con los productos de hidrólisis de AmiJ33-ABCD, se observó que son similares en cuanto a la generación de glucosa (GP1), maltosa (GP2) y maltotriosa (GP3), pero no para la maltotetraosa (GP4). Tal parece que la región extra C-terminal (dominio D) está relacionada con la generación de un producto de mayor tamaño (GP4) al inicio de la reacción. Es decir, posiblemente la adición de un dominio más (dominio D) esté modificando la conformación del sitio activo de la enzima, principalmente los aminoácidos auxiliares en la triada catalítica, generando una enzima más compacta o más cerrada y esto conlleve a modificar los subsitios de la enzima. Al comparar los productos de hidrólisis de AmiJ33-ABCD con AmiJ33r, se concluyó que son similares pues ambas enzimas generan glucosa (GP1), maltosa (GP2), maltotriosa (GP3) y maltotetraosa (GP4) (Hernández-Heredia *et al.*, 2017, congreso SMBB).

En trabajos reportados para la α -amilasa TS-23 de *B. subtilis* (Fen *et al.*, 2002) se realizaron versiones truncadas en donde se eliminó de la región C-terminal de la enzima al SBD y observaron que no se generaron cambios en el patrón de productos de hidrólisis. Lo anterior contrasta con el presente trabajo, donde las versiones de menor peso molecular producen productos de bajo grado de polimerización y viceversa. Sin embargo, en trabajos reportados para la α -amilasa AmyP (dominio A/B y C) de la familia GH13 (Liu *et al.*, 2017)

se demuestra que haciendo mutaciones principalmente en el sitio activo de la enzima, se pueden desencadenar una serie de cambios como la generación o desaparición de subsitios involucrados en el anclaje del sustrato y esto conlleva a modificar la generación de productos de hidrólisis, caso que sucede con AmyP Δ SBD y AmyP Δ SBD-E221Q (mutación realizada en el sitio activo, E221Q) ambas enzimas fueron cristalizadas con el sustrato maltosa y maltotriosa, respectivamente. Se observaron diferencias, en AmyP Δ SBD-E221Q se observó la generación de dos subsitios más (-1 y -4) mientras que en AmyP Δ SBD solo están involucrados los subsitios -2 y -3, esto se debe principalmente a la orientación y participación de los aminoácidos involucrados en el anclaje de los sustratos, caso que puede estar sucediendo con AmiJ33-ABCD y AmiJ33r ya que la adición del dominio D y E pueden estar modificando la conformación del sitio activo y sus subsitios.

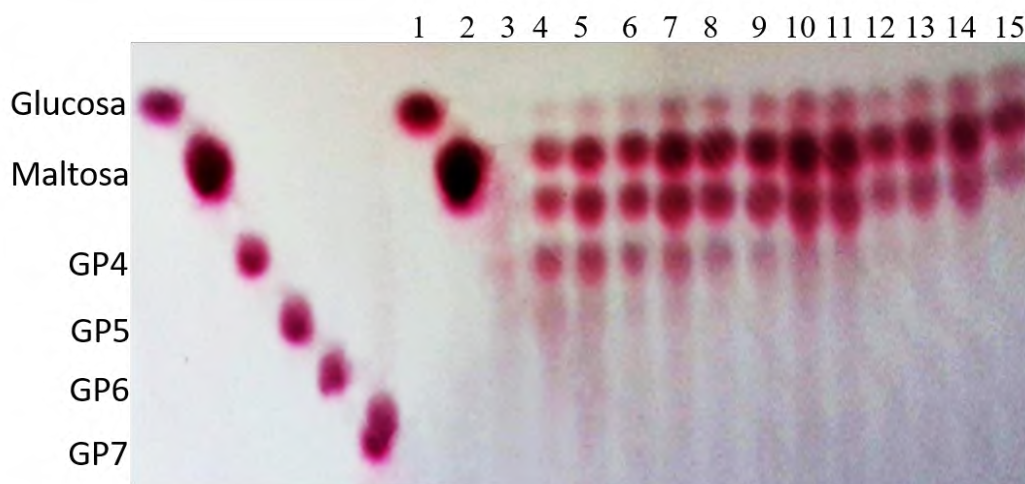


Figura 47. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de AmiJ33-ABCD empleando como sustrato almidón gelatinizado (10 g/L). Sistema: Butanol/etanol/agua 30:50:20. Estándares: Glucosa, maltosa, GP4, GP5, GP6 y GP7, 1: Glucosa. 2: Maltosa. 3: 0 min. 4: 10 min. 5: 20 min. 6: 30 min. 7: 40 min. 8: 50 min. 9: 60 min. 10: 70 min. 11: 80 min. 12: 90 min. 13: 100 min. 14: 110 min. 15: 120 min.

La ventaja de las α -amilasas (AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M con respecto a AmyP y AmyP Δ SBD (Pen *et al.*, 2014) es que tienen una alta afinidad hidrolítica hacia almidón gelatinizado de papa (AmiJ33 y AmiJ33-ABCD) y almidón nativo de papa (marca, Eslab) como es el caso de AmiJ33 (Hernández-Heredia y del Moral S., 2016). Esto indica que las α -amilasas obtenidas en ese trabajo podrían utilizarse para la licuefacción de almidón y la formación de oligosacáridos de cadena corta. También estas α -amilasas pueden tener aplicación, por ejemplo, en la industria textil, ya que presentan su mayor actividad a pHs alcalinos (AmiJ33r y AmiJ33-ABCD) o en la industria de panificación y producción de jarabes fructosados (AmiJ33). Sin embargo, si se necesita una enzima con una eficiencia catalítica mayor se elegiría a AmiJ33, que además hidroliza tanto el almidón gelatinizado como el nativo. La hidrólisis del almidón nativo puede ser ventajosa en algunas industrias ya que se omitiría el proceso de gelatinización del almidón para obtener sus derivados.

Con los resultados bioquímicos y cinéticos obtenidos de AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33 y su comparación estructural se puede sugerir que la región C-terminal (Dominio D y E) mejora el desempeño de la enzima a pH alcalinos y la termoestabilidad a 40, 50 y 60°C. Es posible que el dominio D evite la hidrólisis de almidón nativo y sea el responsable del cambio de especificidad de la enzima, puesto que la versión AmiJ33-ABCD es incapaz de hidrolizar almidón nativo, además, el dominio D favorece la producción de maltooligosacáridos de mayor grado de polimerización (GP4). Cabe mencionar que la maltotetraosa (GP4) tiene aplicación en la industria alimentaria para mejorar la textura y reducir la dulzura de los alimentos sin afectar su sabor, también es utilizado como prebiótico (Maalej *et al.*, 2014). Sin duda el dominio E (SBD) disminuye la producción de azúcares reductores y la afinidad por el sustrato.

6.7 Purificación del SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

El SBD se obtuvo intracelularmente con el reactivo Bugbuster 1X. Posteriormente, se purificó por cromatografía de afinidad con la resina de Ni-NTA (QIAGEN®), las eluciones con mayor actividad se mezclaron. La proteína total obtenida para el SBD fue de 0.345 mg/mL.

El peso molecular calculado a partir de la secuencia aminoacídica *in silico* del SBD es 11 kDa. Sin embargo, los componentes del sitio de unión múltiple del plásmido utilizado (pET101D/TOPO) para la clonación y expresión del SBD incrementa el peso molecular 3 kDa. Con el incremento del peso molecular del SBD, finalmente, en el análisis de la secuencia se observó un peso molecular aproximado de 13 kDa (Fig. 48).

El SBD se clonó correctamente, el resultado de la secuencia se muestra en la sección 6.2.2, por tal motivo la proteína se expresó correctamente. Sin embargo, en el zimograma no se observó un halo de degradación (transparente) lo cual indica que el SBD no presenta actividad enzimática (Fig. 48), ya que la función principal del SBD es ayudar al dominio catalítico a unirse al almidón nativo (insoluble) y degradarlo (Southall *et al.*, 1999).

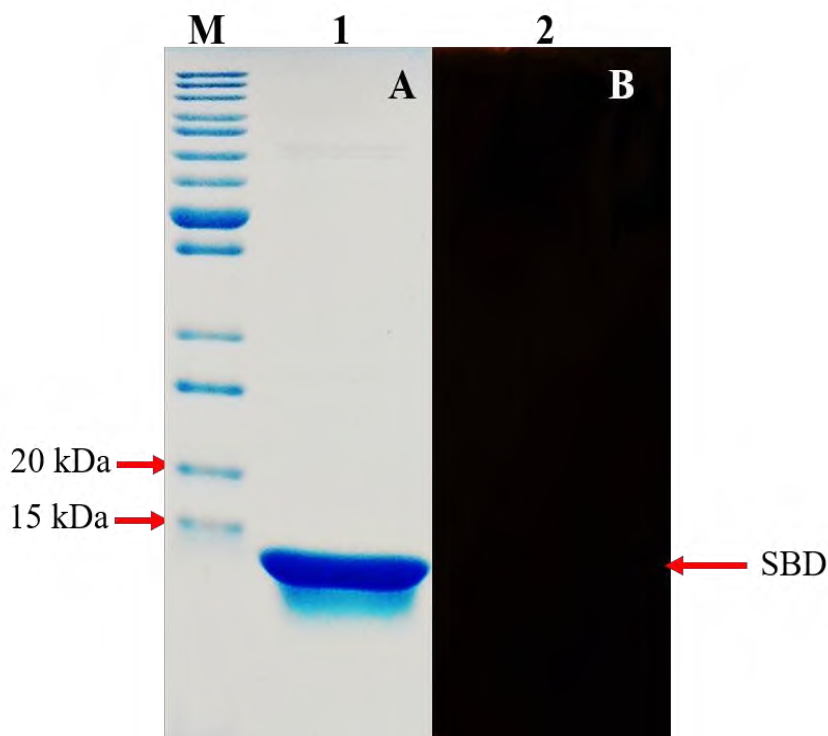


Figura 48. Zimograma del SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A). Tinción con azul de Coomassie. B). Zimograma, teñido con lugol. M: marcador de molecular (PageRuler Unstained Protein Lad). 1 y 2: SBD.

6.8 Región putativa SBD y ensayos de unión a sustrato (almidón nativo)

6.8.1 SBD y adsorción a almidón nativo de papa, marca Eslab y maíz, marca Meyer

Una de las principales funciones del SBD y la más importante es unirse a almidón nativo y promover su degradación por el dominio catalítico. Sin embargo, la α -amilasa recombinante de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (AmiJ33r) a pesar de que contiene un SBD putativo no hidroliza almidón nativo y tiene un efecto negativo en la eficiencia catalítica de la enzima (Montor-Antonio *et al.*, 2017), por tal motivo, en este trabajo se evaluó la funcionalidad del SBD en almidón nativo de papa y maíz.

Para ello se cuantificó la proteína que no se adsorbió (proteína libre) al almidón nativo de papa y maíz, y se utilizaron proteínas de referencia, AmiJ33-ABCD y BSA (Fig. 49 y 50). La BSA no se adsorbió en almidón. AmiJ33-ABCD presentó una adsorción en almidón de papa y maíz de 7% a 2.5 mg/mL y 10% a 10 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, el SBD presentó una adsorción en almidón de papa y maíz de 10.6 % con 5 mg/mL y 17% con 5 mg/mL, respectivamente. Con estos resultados se puede observar que el SBD sí tiene mayor porcentaje de adsorción que AmiJ33-ABCD, aunque su porcentaje de adsorción es bajo comparado con otros dominios SBD, por ejemplo, el SBD de la α -amilasa AmyP y de la α -amilasa de *Bacillus sp.* TS-23 se adsorben 80 y 60% en almidón en 120 min y 60 min, respectivamente (Peng *et al.*, 2014, Lo Huei Fen *et al.*, 2002)

En trabajos reportados de adsorción de almidón para la α -amilasa de *Lactobacillus plantarum* S21 (Kanpiengjai *et al.*, 2017), se menciona que agregan 300 mg/mL de enzima a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL de almidón nativo y obtienen una adsorción de aproximadamente 15% y 32% en concentraciones de 5 mg/mL y 25 mg/mL de almidón, respectivamente. Comparando estos resultados con los reportados para el SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se puede discutir que a pesar de que se agregaron sólo 100 mg/mL de enzima a concentraciones de 0, 2, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL, se logró obtener una adsorción de 10 % y 17 % en concentraciones de 5 mg/mL de almidón nativo de papa y maíz, respectivamente. Cabe resaltar que se obtiene un porcentaje mayor de adsorción con el SBD de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M en la concentración de 5 mg/mL de almidón que con la α -amilasa de *Lactobacillus plantarum* S21 (Kanpiengjai *et al.*, 2017).

El SBD, AmiJ33-ABC y BSA libre se analizaron en geles SDS-PAGE, en donde se colocó el sobrenadante recolectado después de separarlo del almidón de papa y maíz. En las figuras 50B, 50C, 50D, 51B, 51C y 51D se observa que no hay diferencia entre la muestra sin almidón (0 mg/mL) y con almidón (2, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL). Es decir, la unión del 10 y 17% del SBD al almidón de papa y maíz, respectivamente, es imperceptible, en este experimento, lo cual señala que si bien el SBD tiene una afinidad por el almidón ésta no es lo suficiente para determinar su funcionalidad.

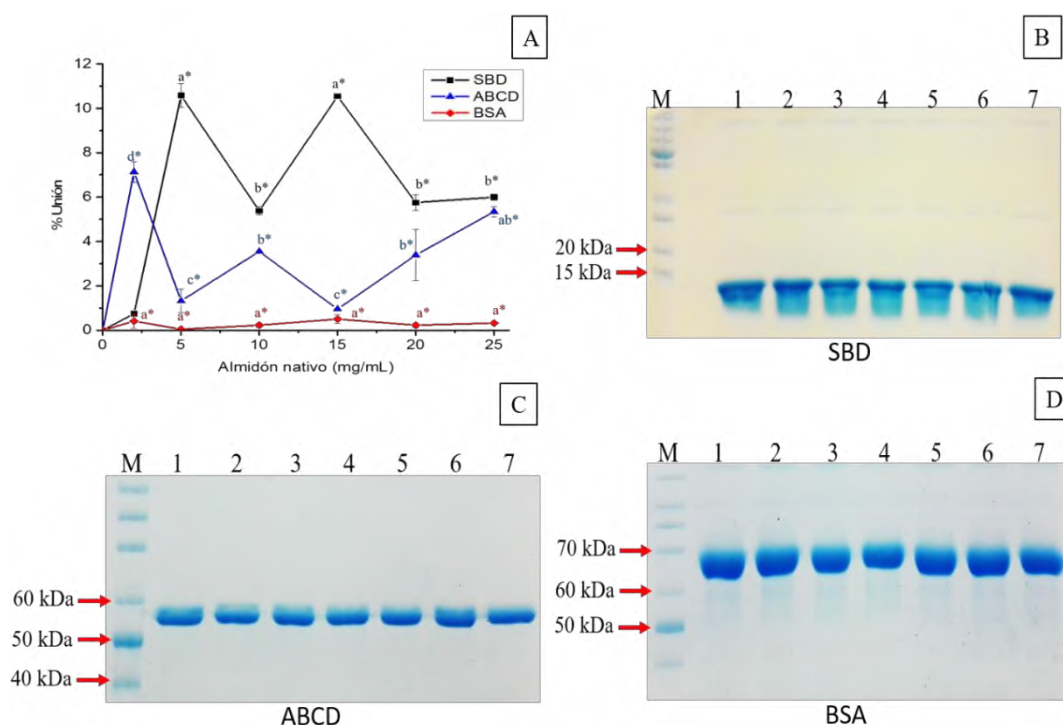


Figura 49. Ensayos de unión a almidón de papa con la versión truncada AmiJ33-ABCD, SBD y BSA. A). Grafica de unión a almidón con AmiJ33-ABCD, SBD y BSA. Medición realizada por espectofotometría. B). SDS-PAGE de las reacciones del SBD (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. C). SDS-PAGE de las reacciones de la versión truncada AmiJ33-ABCD (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. D). SDS-PAGE de las reacciones de BSA (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. M: marcador de peso molecular. 1: muestras* sin almidón. 2: muestras* con 2 mg/mL de almidón. 3: muestras* con 5 mg/mL de almidón. 4: muestras* con 10 mg/mL de almidón. 5: muestras* con 15 mg/mL. 6: muestras* con 20 mg/mL de almidón. 7: muestras* con 25 mg/mL de almidón que fueron mezclados con amortiguador de fosfatos pH 8.0, 50 mM a 4°C por 2 h a 120 rpm. *muestras SBD, AmiJ33-ABCD y BSA según sea el caso para cada gel SDS-PAGE.

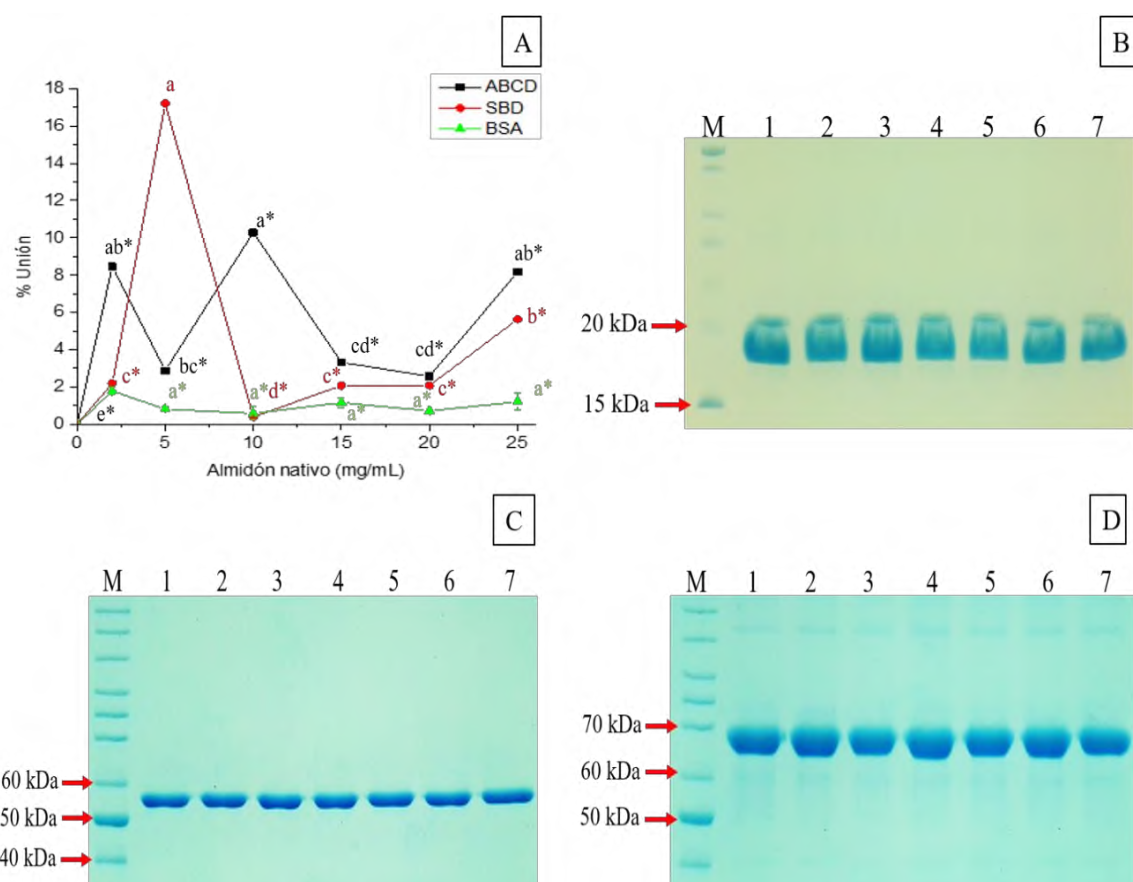


Figura 50. Ensayos de unión a almidón de maíz con la versión truncada AmiJ33-ABCD, SBD y BSA. A). Grafica de unión a almidón con AmiJ33-ABCD, SBD y BSA. Medición realizada por espectofotometría. B). SDS-PAGE de las reacciones del SBD (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. C). SDS-PAGE de las reacciones de la versión truncada AmiJ33-ABCD (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. D). SDS-PAGE de las reacciones de BSA (100 µg/mL) con almidón nativo, adsorción. M: marcador de peso molecular. 1: muestras* sin almidón. 2: muestras* con 2 mg/mL de almidón. 3: muestras* con 5 mg/mL de almidón. 4: muestras* con 10 mg/mL de almidón. 5: muestras* con 15 mg/mL. 6: muestras* con 20 mg/mL de almidón. 7: muestras* con 25 mg/mL de almidón que fueron mezclados con amortiguador de fosfatos pH 8.0, 50 mM a 4°C por 2 h a 120 rpm. *muestras SBD, AmiJ33-ABCD y BSA según sea el caso para cada gel SDS-PAGE.

CONCLUSIONES

La eliminación de la región C-terminal (dominio D y E) tiene efecto en el comportamiento bioquímico y cinético de la enzima, su eliminación en AmiJ33r y AmiJ33-ABCD reveló que está proporcionando estabilidad a pHs alcalinos y a pHs ligeramente ácidos como es el caso de AmiJ33. Con respecto la temperatura, los dominio D y E no influyen pues se mantiene el mismo rango de temperatura óptima (80°C) en AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33. Sin embargo, al evaluar la termoestabilidad en estas α -amilasas, la región C-terminal parece estar involucrada directamente en la estabilidad de la enzima.

Otras condiciones evaluadas e importantes, fueron los parámetros cinéticos. Los datos indican que la presencia de la región extra C-terminal (dominio D y E) influye negativamente en la eficiencia catalítica de la enzima (K_{cat}/K_m).

Con respecto a los oligosacáridos derivados de la hidrólisis del almidón empleando las enzimas AmiJ33r, AmiJ33-ABCD y AmiJ33, se concluye que las versiones proteicas más pequeñas producen productos de menor tamaño, lo que indica que la región extra C-terminal (dominio D y E) influye positivamente en la producción de GP4 (maltotetraosa). Posiblemente, su presencia representa un impedimento estérico alrededor del dominio catalítico o altera la conformación del sitio activo, principalmente en la triada catalítica o aminoácidos auxiliares involucrados en la catálisis.

La región de unión a almidón (SBD) encontrada en el C-terminal se adsorbe en almidón nativo de papa y maíz, 10% y 17%, respectivamente. Sin embargo, debido a la baja adsorción del SBD en los almidones evaluados hace necesario la búsqueda de otros experimentos que determinen con certeza si efectivamente el SBD es funcional.

PERSPECTIVAS

- Obtener la versión truncada AmiJ33-ABC y caracterizarla en cuanto al efecto de pH y estabilidad a pH, el efecto de la temperatura, la termoestabilidad y los parámetros cinéticos como K_m y V_{max} , con la finalidad de demostrar si la región N y el dominio C de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M tienen efecto en la actividad, especificidad del sustrato y en las propiedades bioquímicas de la enzima. Esto con el fin de ver si AmiJ33-ABC y AmiJ33 nativa son las mismas enzimas.
- Proponer α -amilasas quiméricas que contengan la región putativa (SBD) en tándem con la finalidad de obtener una α -amilasa que hidrolice almidón nativo en altas concentraciones y tenga la capacidad de aumentar su afinidad a diferentes fuentes botánicas de almidón.
- Cristalizar la α -amilasa (AmiJ33) de *B. amyloliquefaciens* JJC33M con su sustrato para tener la estructura predicha y observar cuales son los aminoácidos que intervienen en los sitios de unión a sustrato, observar si contiene los aminoácidos aromáticos conservados, observar cuales aminoácidos están involucrados en el dominio catalítico, principalmente en la triada catalítica y así poder realizar modificaciones para obtener una α -amilasa con características competentes.

REFERENCIAS

- Abe, A., Tonozuka, T., Sakano, Y., Kamitori, S. 2004. Journals Molecular Biology. Structure. 335: 811–822.
- Apinun, K., Thu-Ha N., Dietmar, H., Chartchai, K. 2017. Expression and Comparative Characterization of Complete and C-terminally Truncated Forms of Saccharifying α -amylase from *Lactobacillus plantarum* S21. International Journal of Biological Macromolecules.
- Arikan, B. 2007. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U., Legge, R. L. 2007. A thermostable amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering. 79: 950-955.
- Atwell, W. A., Hood, L. F., Lineback, D. R., Varriano-Marston, E., Zobel, H.F. 1988. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. Cereal Food World. 33: 306-311.
- Bano, S., Qader, S., Aman Afsheen., Syed M., Azhar A. 2011. Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. American Association of Pharmaceutical Scientists. 12: 255-261.
- Belitz, H. D and Crosch, W. 1988. Química de los alimentos. ACRIBIA, Zaragoza. 257-264.
- Bello-Pérez, L. A., Contreras-Ramos, R. Romero-Manilla, J. Solorza-Feria, y A. Jiménez-Aparicio. 2002. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. Macho). Agrociencia 36: 169–180.
- Bello-Pérez, L. A., Paredes-López, O. 1999. El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. Ciencia. 50: 29-33.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., Davies, G. J. 2004. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. Biochemistry Journals. 382: 769–781.
- Boraston, A. B., Healey, M., Klassen, J., Ficko, B. E., Lammerts, B. A and Law, V. 2006. A structural and functional analysis of alpha-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. Journal Biology Chemistry. 281: 587-598.
- Carbohydrate-Binding Module family classification. Recuperado el 27 de Febrero del 2016, de <http://www.Cazy.org>.
- Cockburn, D., Nielsen, M. M., Christiansen, C., Andersen, J. M., Rannes J. B., Blennow. A., Svensson, B. 2015. Surface binding sites in amylase have distinct roles in recognition of starch structure motifs and degradation. International Journal of Biological Macromolecules. 75: 338-345.

Coultate, T. P. 1997. Manual de química y bioquímica de los alimentos. Segunda edición ACRIBIA, Zaragoza. 29-36.

Chica, L. 1996. Sacarificación del almidón de papa. Trabajo de pregrado. Bogotá-Colombia: Universidad Nacional de Colombia: 165 páginas.

Da Lagea, J. L., Etienne, G.L., Danchinc, E. G. L., Casane, D. 2007. Where do animal α -amylase come from an interkingdom trip. Federation of European Biochemical societies. 581: 3927-3935.

Davies, G., B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure 3:853-859.

Efecto de la variación de pH en la actividad enzimática. 2018. Recuperado el 22 de Febrero del 2018, de <http://laguna.fmedic.unam.mx>.

Espinoza, S. V. 2008. Estudios estructurales de almidón de fuentes no convencionales: Mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa paradisiaca* L.). Tesis de maestría. Yautepec, Morelos, México.

Fu, L. L., Z. R. Xu, W. F. Li, J. B. Shuai, P. Lu, and C. X. Hu. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. Biotechnology. Adv. 25: 1-12.

Fullbrook, P. D. 1984. The enzyme Production of glucose syrups. En glucose Syrups: Science and Technology. Editores: Dziedzic, S.Z. y Kearsley, M.W. Elsevier Applied Science, London. 65-115.

Grossman, T., Kawasaki, E.S., Punreaddy, S. R, Osburne, M. S. 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. Gene. 209: 95-103.

Guillen, D., Sánchez, S., Sanoja-Rodríguez, R. 2010. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. Applied Microbiology Biotechnology. 85: 1241-1249.

Gupta, R., G. Paresh, H. Mohapatra, V. Kumar, and B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry. 38: 1.599-1.616.

Harwood, C. R. and R. Cranenburgh. 2008. *Bacillus* protein secretion: An unfolding story. Trends Microbiology. 16: 73-79.

Hendriksen, P. M., Pedersen, S., Bisgard-Frantzen H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application. WO 99/35325.

Hernández-Heredia S and Del Moral S. 2016. Biochemical and Kinetic Characterization of the α -Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, AmyJ33, on Raw Starch. JSM Biotechnology Bioengineering 3: 1067.

Hernández-Heredia, S., Olvera-Carranza, C., Peña-Castro, J. M y Del Moral Ventura, S. 2017. Estudio del dominio C y de la región C-terminal de la α -amilasa de *B.*

amyloliquefaciens JJC33M. En: XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Regalado (Presidencia). Congreso llevado a cabo en Puerto Vallarta, Jal.

Hernández-Medina, M., Torruco, U. J., Chel, G. L., Betancur, A.D. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3: 718-726.

Hizukuri, S. 1985. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. Carbohydrate Research 141: 295-306.

Hua, Y. W., Chi, M. C. H., Lo, H. F., Hsu, W. H., Lin, L. L. 2004. Fusion of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II with the raw starch binding domain of *Bacillus sp.* strain TS-23 α -amylase generates a chimeric enzyme with enhanced thermostability and catalytic activity. Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology 31: 273–2.

I-TASSER. 2018. Recuperado el 3 de Enero del 2018, de <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.

Janecek, S and Sevcik, J. 1999. The evolution of starch binding domain. Federation of European Biochemical Societies. 456: 119-125.

Janecek, S. 2002. How many conserved sequence regions are there in the α -amylase family. Biología. 57: 29-41.

Jevsevar, S., Palcic, J., Jalen, S., Pavko, A. 2007. Influence of the media composition on behavior of pET expression system. Acta Chimica Slovenica. 54: 360-365.

Juge, N., Le, G. C., Furniss, C. S. M., Gunning, P., Kramhøft B., Morris V. J., Svensson B., y Williamson G. 2002. The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. FBiologia, 57: 239-245.

Kennedy, J. F., Cabalda, V. M., White, CA. 1988. Enzymec starch utilization ang genetic engineering. Trends Biotechnology. 6: 1044-105.

Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. 2002. Industrial enzyme applications. Current Opinion Biotechnology.13: 345-351.

Knegtel, R. M., Strokopytov, B., Penninga, D., Faber, O. G., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B.W. 1995. Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain with natural substrates and products. Journal Biology Chemistry. 270: 29256-29264

Knutzon, C. A., Grove, M. 1994. Rapid method for estimation of amylose in maize starches. Cereal Chemistry. 72:469.

Koropatkin, N. M., and Smith, T. J. 2010. A unique cell-membrane associated α -amilasa from a prominent human gut symbiont targets complex starch molecules. Structure 18,200-215.

Kubrak, I., Storey M, J., Storey B, K. Lushchak, I, V. 2010. Production and properties of amylase from B. sp. BKL20.Can Journal Microbiology. 56: 279-288.

- Kurien, Biji and Hal Scofield, R. 2012. Common Artifacts and Mistakes Made in Electrophoresis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 869. 633-40. 10.1007/978-1-61779-821-4_58.
- Lineback, D. R., Rasper, V. F. 1988. Wheat carbohydrates. In: *Wheat Chemistry and Technology*. 1: 227-372.
- Lo, H. F., Lin, L. L., Chiang, W. Y., Chie, M. C., Hsu, W. H and Chang, C. T. 2002. Deletion analysis of the C-terminal region of the α -amylase of *B. subtilis* sp. Strain TS-23. *Archived microbial*. 178: 115-123.
- Lo, H. F., Lin, L. L., Li, C. C. *et al.* 2001. The N-Terminal Signal Sequence and the Last 98 Amino Acids Are Not Essential for the Secretion of *Bacillus* sp. TS-23 α -Amylase in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 43: 170.
- Long, J. E. 1986. High fructose corn syrup. *Cereal Food World*. 31: 862-865.
- Luenser, S. J. 1983. Microbial enzymes for industrial sweetener production. *Developments in industrial Microbiology Series*. 24: 79-96.
- Ly H. D., Withers., S.G. 1999. Mutagenesis of glycosidases. *Annu Review Biochemistry*. 68: 487-522.
- Maalej, H., Ayed, H., Ghorbel B., Olfa, N., Moncef, H, Noomen. 2014. Production and Biochemical Characterization of a High Maltotetraose (G4) Producing amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *BioMedic Research International*. 156438. 10.1155/2014/156438.
- MacAllister, R. V. 1979. Nutritive sweeteners made from starch. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, editorial. Tipson, R. S. & Horton, D. 36: 15-56.
- Mehta, D and Satyanarayana, T. 2014. Domain C of thermostable α -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1-17.
- Montor, A. J. J., Olvera C. C., Reyes D. D., Sachman R. B., Ramírez C. L. P., y del Moral V. S. T. 2014. Biochemical Characterization of AmiJ33 an amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region. *Nova Scientia*, 6: 39-59.
- Montor-Antonio, J. J., Hernández-Heredia, S., Ávila, A., Olvera, C., del Moral, S. 2017. Effect of differential processing of the native and recombinant α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M on specificity and enzyme properties.
- Moreno, Q. M., Montoya, O. I. C., Guitierrez, S. P. 2010. Purificación y caracterización de una α -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna*. 162: 31-38. ISSN 0012-7353.
- Munck, L., Rexen, F and Haastrup, L. 1988. Cereal starches within the European Community: agricultural production, dry and wet milling and potential use in industry. *Starch/Staerke* 40:3, 81-87.

- Nielsen, J. E and Borchert, T. V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochemical et Biophysical Acta Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543: 253-274.
- Ospina, B and Ceballos, H. 2002. La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Cali, Colombia. 131-147.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R. 2003. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 31: 135-52.
- Prasanna V. A. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. 4: 1525-1529.
- Rabhi, E. I., Sadok, A., Khalaf, N., and Fathallah, D. M. 2007. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Engineering Des Sel*, 5: 201-209.
- Ring, S. G., Gee, J. M., Whittam, M., Orford, P and Johnson I. 1988. Resistant Starch. Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. *Food Chemistry*. 28: 97–109.
- Rodríguez-Sanoja, R., N. Oviedo, y S. Sánchez. 2005. Dominio de unión a almidón Microbial. *Curr. Opin. . Microbiology* 8: 260-267.
- Rodríguez-Sanoja, R., Oviedo, N., Escalante, L., Ruiz, B., Sánchez, S. 2009. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 36: 341–346.
- Rye. C.S and S. G Withers. 2000. Glycosidase mechanisms. *Cur Opin Chemistry Biology*. 4: 573580.
- Saito, N. A. 1973. Thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochemistry Biophysical*. 155: 290-8.
- Salimi, A., Fatemeh, Y., Marzieh. G., Sara, D., Hesam, T., Sirous. G., and Khosro, K. 2012. Investigations on Possible Roles of C-Terminal Propeptide of a Ca-Independent α -Amylase from *Bacillus*. *Jornal Microbiology Biotechnology*, 22: 1077-1083.
- Simair, I. A., Qureshi, A. S., Khushk, I. *et al.* 2017. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., y Pandey A. 2006. α -amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments. *Food Technology Biotechnology*. 44: 173-184.
- Sivolí, L., Pérez, E and Lares, M. 2009. Studies of conformational changes, crystalline and granular structures, and in vitro digestibility of cross-linked and methylated corn starches. [Online]. Enero. 2009, vol. 34, no.1 [citado 11 de Octubre del 2017], 052-056. Disponible en la World Wide Web: ISSN 0378-1844.

- Slaughter, S. L., Ellis, P. R and Butterworth, P. J. 2001. An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinized starches. *Biochemical et Biophysical Acta* 1525: 29-36.
- Sorimachi, K., LeGal-Coeffet, M. F., Williamson, G., Archer, D. B., Williamson, M.P. 1997. *Structure*. 5: 647–661.
- Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H. J., Williamson, G., Williamson, M. P. 1999 *FEBS Letters*. 447: 58–60.
- Streb, S., Zeeman S. 2012. Starch Metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* American Society of Plant Biologists 10 e0160.PMC. Web. 28 Feb. 2016.
- SWISS-MODEL. 2018. Recuperado el 3 de Enero del 2018, de <https://swissmodel.expasy.org/interactive>.
- Teodoro de Souza, C., Martins, L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 298-302.
- Tovar-Benitez, T., Palacios, F., Castro Rojas, J., Gomez-Aldapa., Millan-Malo, B.M., del Real, M. 2013. Effect of the alkaline and acid treatments on the physicochemical properties of corn starch. *Journal of Food Science*.
- Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. 1998. Enzymes in low water systems *Crit. Rev. Biochemistry Molecular Biology*. 33: 53-89.
- Vaclavik, A. V. 2002. *Essentials of food science*. 1ª edición (págs. 508). España: Acribia Editorial.
- Van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journals Biotechnology*. 94: 137-155.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V. 2010. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable -amylase. *Tropical Agricultural Res.*22:1-11
- Zelevnak, K. J. and Hoseney, R. C. 1987. The glass transition in starch. *Cereal Chemistry*. 64: 121-124.
- Zhenghui, L., Chaoguang, T., Aiying L., Guimin, Z., Yanhe, M. 2014. Identification and characterization of a novel alkaline α -amylase Amy703 belonging to a new clade from *Bacillus pseudofirmus*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 41: 783–793.
- Zhenghui, L., QinHong, W., Sijing, J., Guimin Z & Yanhe M. 2017. Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermos-stability and specific activity of alkaline α -amylase Amy703. *Scientific Reports*.

ANEXOS

ANEXO I. Secuencia de aminoácidos de las versiones truncadas de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, AmiJ33 (sin péptido señal).

>AmiJ33-AB

VTASSVKSGTILHAWNWSFNTLTQNMKDIRDAGYAAIQTSPINQVKEGNQGDKSMRNWYWLYQPTS
YQIGNRYLGTEQEFGDMCAAAEKYGVKVIQDAVINHTTSDYSAISDEIKRIPNWITHGNTQIKNWS
RWDVTQNSLLGLYDWNTOQTEVQTYLKRFLERALNDGADGFYDAAKHIELPDDGNYGSRFWPNIT
NTAAEFQYGEILQDSASRDYAYANYMNVASNYGHSIRSALKNRNLSVSNISHYASDVSADKLVTW
VESHDYANDEEESTWMSDDDIRLWAVIGSRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPGKSQIGDRGSALF
KDOAITAVNIFHNMVG

>AmiJ33-ABC

[illegible]

>AmiJ33 ABCD

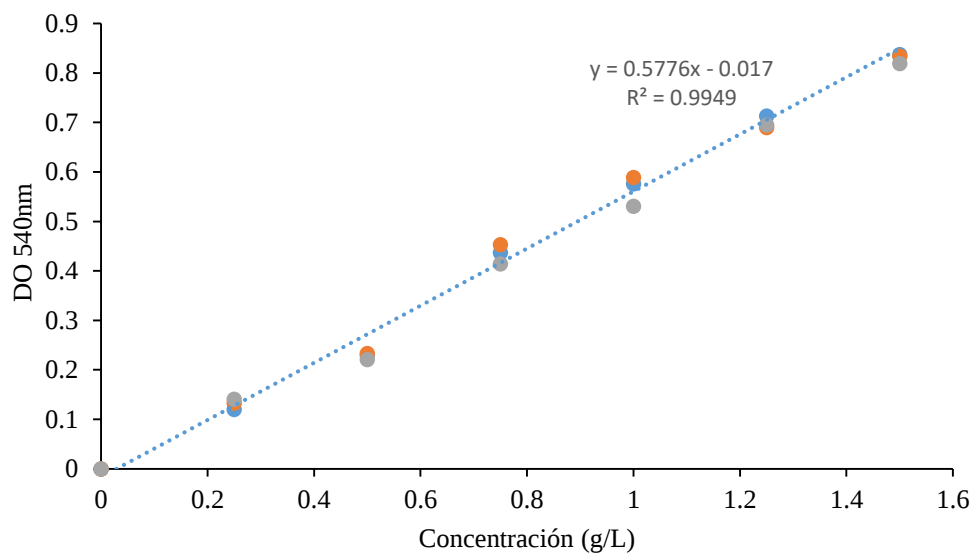
VTASSVKSGTILHAWNWSFNTLTQNMKDIRDAGYAAIQTSPINQVKEGNQGDKSMRNWYWLQPTS
YQIGNRYLGTEQEFGDMCAAEEKYGVKVIQDAVINHTTSDYSAISDEIKRIPNWITHGNTQIKNWS
RWDVTQNSLLGLYDWNQTQNTVQTYLKRFLERALNDGADGFRYDAAKHIELPDDGNYGSRFWPNIT
NTAAEFQYGEILQDSASRDYANYMNVSTASNYGHSIRSALKNRNLSVSNISHYASDVSADKLV
TWEVSHDTYANDEEESTWMSDDDIRLGWAVIGSRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPGKSQIGDRGSALF
KDQAITAVNIFHNVMGGOPEELSNPNNGNNQIFMNQRGSKGVVLNAGSSAVAVNTSTKLDPGRYDN
RAGIGSFQVTNGKLTGTINARSAVLYPDDIGNAPHVFLENYQTGAVHSFNDQLTVTLRANAKTTK
AVYQINNGQQTGFKDGDRLTIGKGDPIGTAYDIKLTGTNSEGAARTQEYTFVK

>SBD (CBM26)

KDPSQANIIGYQNPDPHWGQVNAYIYKHDGGRAIELTGSWPGKAMTKNADGIYTLTLPENADTANAK
VIFNNGSAOVPGONOPGFDYVKNGLYNNSGLNGYLRH

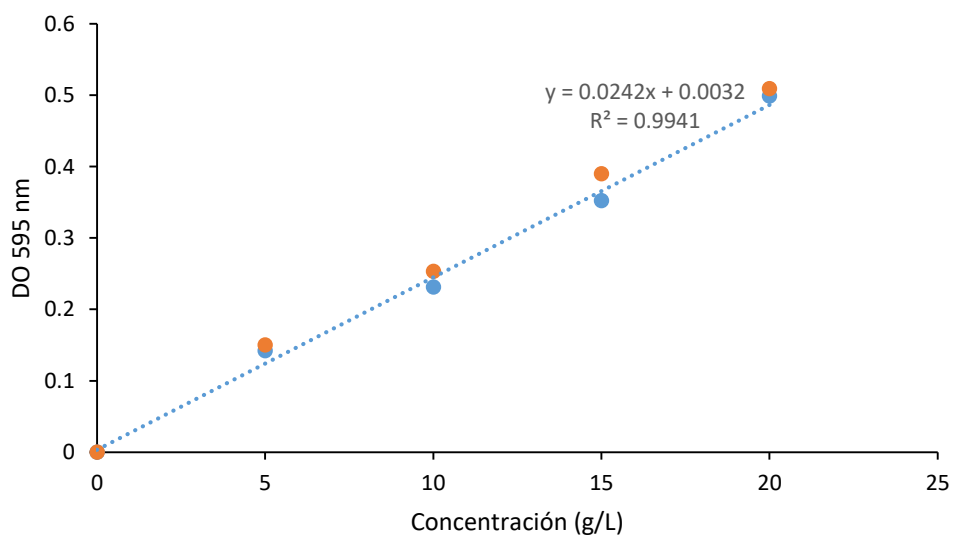
ANEXO II. Curva de calibración de glucosa y BSA

Curva patrón de glucosa



Curva de calibración de glucosa, DNS (Miller, 1959)

Curva patrón de BSA

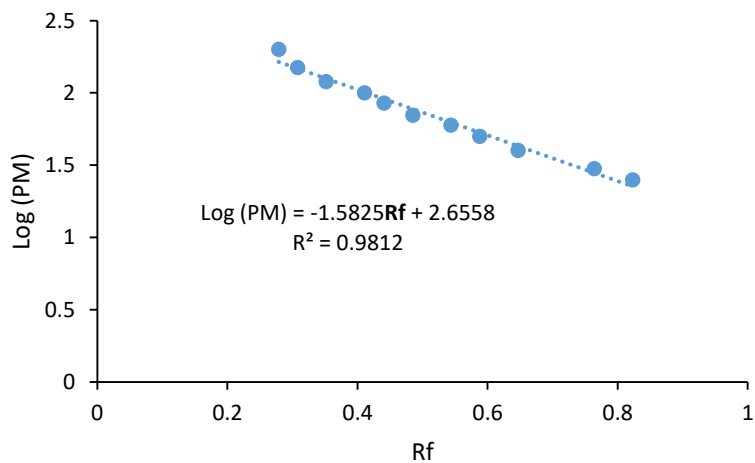
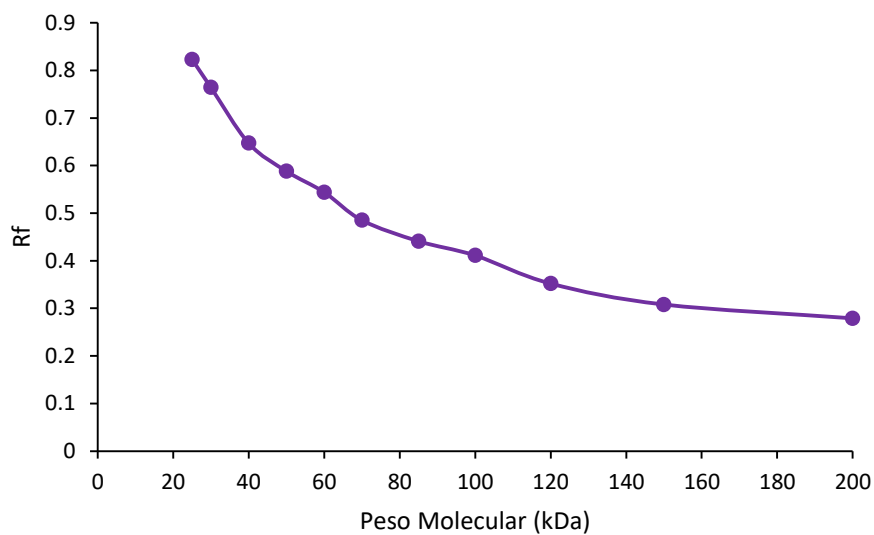


Curva patrón BSA (Bradford, 1976)

ANEXO III. Curva de linearización para la obtención del peso molecular (PM)

AmiJ33-AB

Curva PM vs Rf

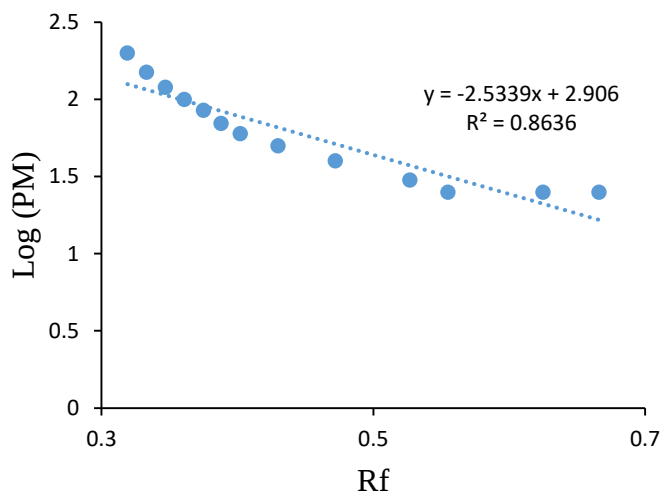
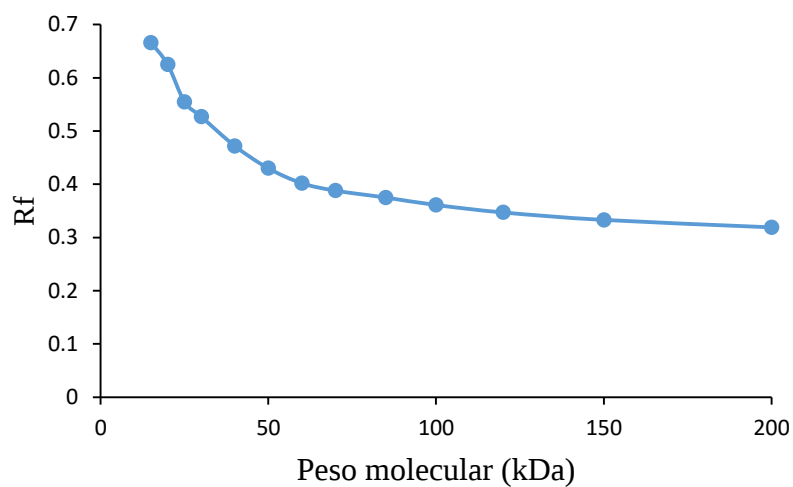


PM (kDa)	Rf
200	0.279
150	0.308
120	0.352
100	0.411
85	0.441
70	0.485
60	0.544
50	0.588
40	0.647
30	0.764
25	0.823
AmiJ33-AB	0.774

ANEXO IV. Curva de linearización para la obtención del peso molecular (PM)

Región putativa SBD (Dominio E)

Curva PM vs Rf



PM (kDa)	Rf
200	0.319
150	0.333
120	0.347
100	0.361
85	0.375
70	0.388
60	0.402
50	0.43
40	0.472
30	0.527
25	0.555
20	0.625
15	0.666
SBD	0.708

ANEXO V. Fórmula para calcular las concentraciones y volúmenes de ligación en molaridad y relaciones molares determinadas.

La fórmula siguiente fórmula permitió calcular la concentración de inserto (Qi) para lograr la relación deseada inserto:vector a partir de mediciones espectrofotométricas.

$$Q_i = \frac{M_i}{((2)(1 \times 10^9 \text{ nm}))} (pBi * 650)(Vr * 1000 \text{ ng})$$

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$Nv = Cv \frac{1 \mu g}{(1000 \text{ ng})}$$

Nv = Factor de conversión ng/μl a μg/μl

$$Mv = Cv \frac{Nv}{(pBv * 650)} (2)(1 \times 10^9 \text{ nm})$$

Mv = Determinación de molaridad de los dos extremos del vector en nM

$$Qv = \frac{F}{(Vr)} \frac{1 \mu g}{(1000 \text{ ng})}$$

Qv = Concentración en μg/μl de vector en la ligación con peso de vector (F, 20-100 ng por 20 μl de reacción) y volumen de reacción deseados (Vr, 10-20 μl).

$$Mv = (Mv)(Pi)$$

Mi= nM necesarios de inserto en ligación para cumplir con la proporción indicada (Pi, 2 = 1:2, 3 = 1:3).

Dónde:

Cv= Lectura de Nanodrop (ng/μl) del vector

Vr=Volumen de reacción (10-20μl)

pBv=Pares de bases (vector)

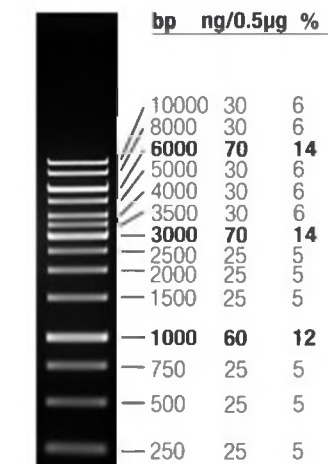
pBi= Pares de bases (Inserto)

Pi= Proporción de inserto (2=1:2, 3=1:3, etc.)

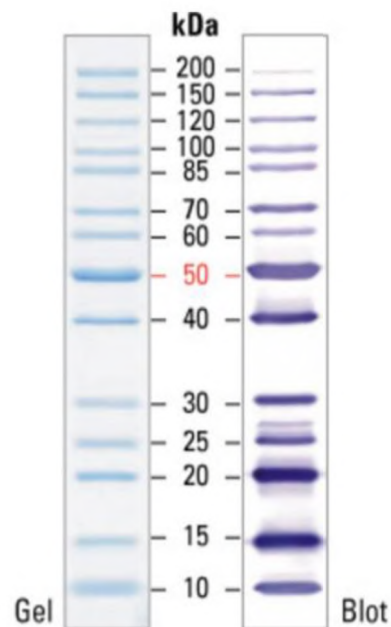
F= ng máximos totales en la ligación (20-100 ng por 20 μ l de reacción)

ANEXO VI. Marcadores de peso molecular para DNA y para proteínas, respectivamente.

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

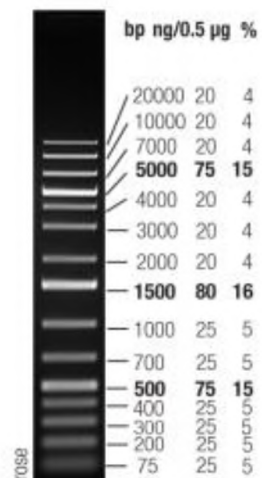


0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min



SDS-PAGE band profile of the PageRuler Unstained Protein Ladder

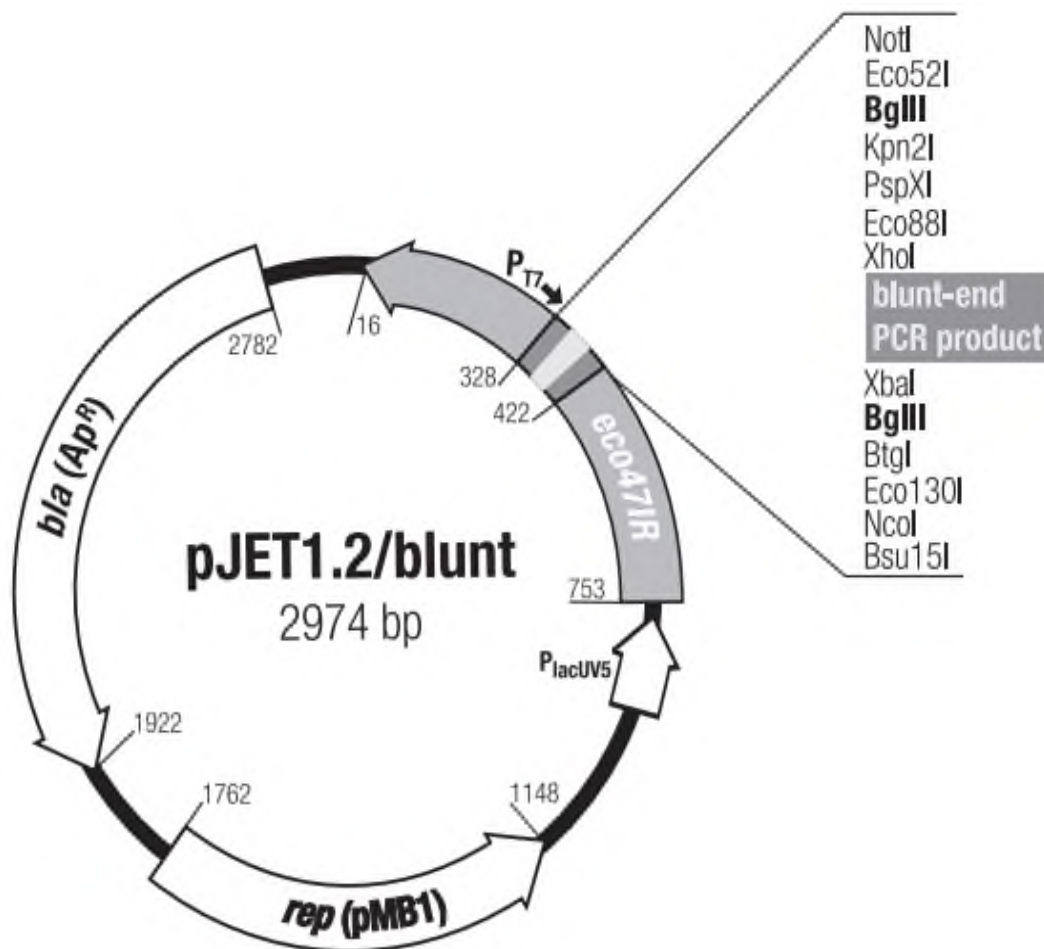
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

ANEXO VII. Plásmidos utilizados en el presente trabajo

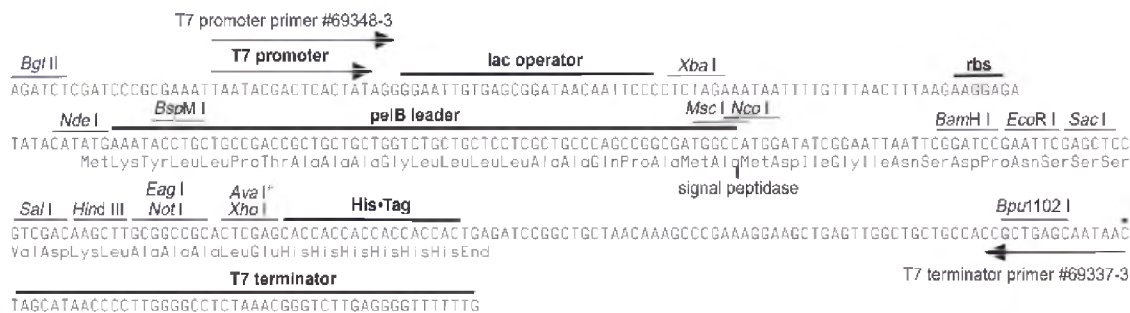
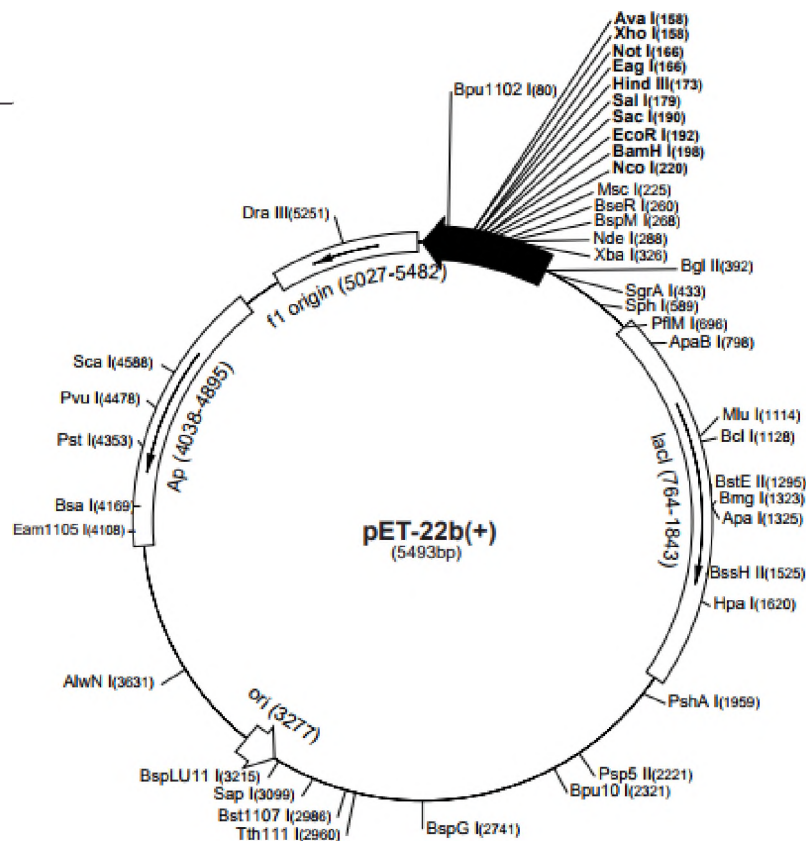
Plásmido pJET1.2/blnt



Plásmido pET22b(+)

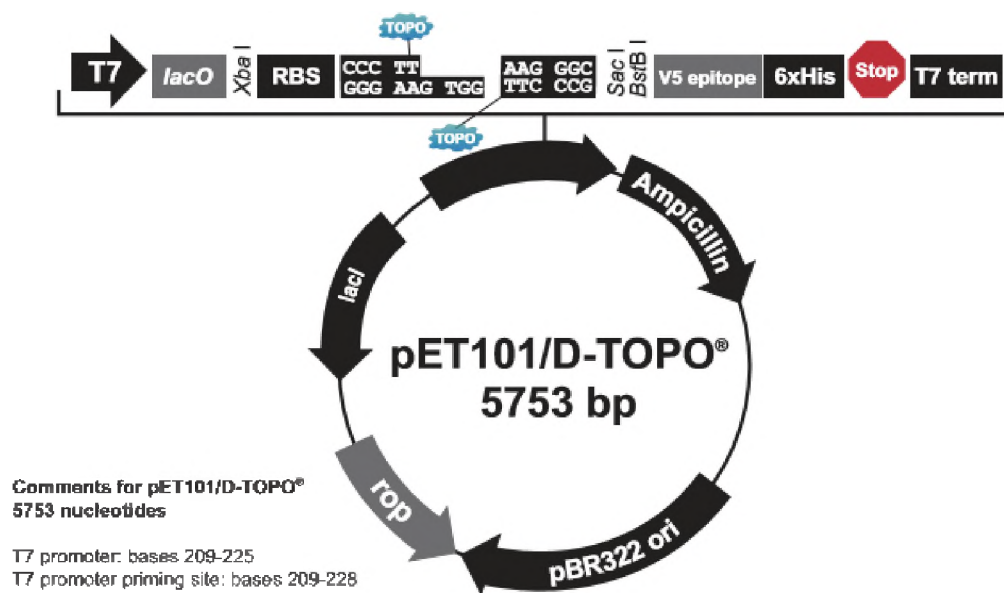
pET-22b(+) sequence landmarks

T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>petB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites	
(<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	156-225
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
<i>bla</i> coding sequence	4038-4895
f1 origin	5027-5482



pET-22b(+) cloning/expression region

Plásmido pET101D/TOPO



T7 promoter: bases 209-225
T7 promoter priming site: bases 209-228
lac operator (lacO): bases 228-252
Ribosome binding site (RBS): bases 282-288, 292-296
TOPO® cloning site (directional): bases 297-310
V5 epitope: bases 333-374
Polyhistidine (6xHis) region: bases 384-401
T7 reverse priming site: bases 455-474
T7 transcription termination region: bases 416-544
bla promoter: bases 845-943
Ampicillin (bla) resistance gene (ORF): bases 944-1804
pBR322 origin: bases 1949-2622
ROP ORF: bases 2990-3181 (complementary strand)
lacI ORF: bases 4493-5584 (complementary strand)

151 GGTGATGCCG GCCACGATGC GTCCGGCGTA GAGGATCGAG ATCTCGATCC CGCGAAATTA ATACGACTCA CTATAGGGGA

231 ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCCTCTAGA AATAATTTTG TTAACTTTA AGAAGGAATT CAGGAGCCCT TCC ACC ATG ...
GGGA AG TGG TAC ...

306 AAG GGC GAG CTC AAT TCG AAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT
Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser

372 ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC
Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***

441 TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCUUTGGGG CCTCTAAACG