

# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

---

---

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“ESTUDIO DE LA  $\alpha$ -AMILASA RECOMBINANTE AmiJ33r Y DEL GEN QUE LA CODIFICA”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:  
**Maestro en Biotecnología**

Presenta:

**IB. JUAN JOSÉ MONTOR ANTONIO**

Asesor:

**DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA**

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, agosto de 2015



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tuxtepec, Oaxaca a 10 de Junio de 2015

IB. Juan José Montor Antonio  
Estudiante de la Maestría en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

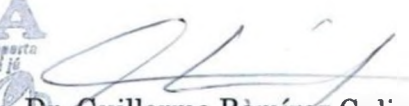
Por este medio le informo que el jurado para su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores


Dra. Ana Karín Navarro Martínez	UNPA	Presidente
Dra. Rosamaría Oliart Ros	ITVer-UNIDA	Vocal
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	Secretario
Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño	UNPA	1er Suplente
Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández	UASLP	2o Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



  
Dr. Guillermo Ramírez Galicia  
Jefe de la División de Estudios de  
Posgrado

  
M en C. Héctor López Arjona  
Vice-rector Académico  
VoBo



Ccp Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura, Asesor  
Ccp LP Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares  
Ccp Archivo

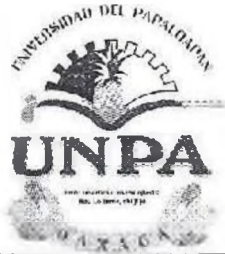
CAMPUS TUXTEPEC

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA

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

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



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO


San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 13 de Julio de 2015

LP 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 Maestro en Biotecnología del IB. Juan José Montor Antonio, matrícula 12140008, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Estudio de la  $\alpha$ -amilasa recombinante AmiJ33r y del gen que la codifica”** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración.

Atentamente,

  
M en C/Héctor López Arjona  
Vice-rector Académico



Cop IB Juan José Montor Antonio  
Cop Archivo

Este trabajo se realizó en la **Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec**, bajo la dirección de la **Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura** con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 154683. Asimismo, se agradece a CONACYT por la beca otorgada (No. de becario 284094).

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi pequeña familia:

A mi esposa Susy López Vicente por ser mi soporte, por creer en mí, por apoyarme en el camino que he elegido y por permanecer pasiva y comprensiva esperando por mí después de una larga jornada en el laboratorio o en la computadora. Te amo.

A mi hija que viene en camino, porque cuando su mami y yo nos enteramos que venía en camino se volvió mi motor de inspiración y de repente todo empezó a salir bien. Espero ser para ella el mejor papá del mundo y el mejor ejemplo de dedicación, esfuerzo y trabajo duro. Ya quiero conocerla y tenerla entre mis brazos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura por guiarme en mi crecimiento como estudiante. Por permitirme ser propositivo, crítico y por dejarme trabajar a mis amplias sin abandonarme académicamente. Por tratarme como igual. Por la confianza, sinceridad, amistad y apoyo brindado. Por ser mi mejor ejemplo de profesionalismo. Por creer en mí y por permitirme formar parte de su crecimiento como investigadora. Por ser una buena jefa. Por todos estos años de trabajo conjunto que llegan a su fin.

A la Dra. Martha Emilia Poisot Vásquez por el apoyo y amistad sincera que me ha mostrado.

Al Dr. Guillermo Ramírez Galicia por su amabilidad, comprensión y paciencia en todo proceso de papeleo. Por el esfuerzo que ha hecho por mantener el posgrado en nuestra universidad.

A los integrantes del comité revisor, Dra. Rosamaría Oliart Ros, Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández, Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, Dr. Enrique Villalobos Amador y Dra. Ana Karín Navarro Martínez, por las observaciones y comentarios hechos.

A mi madre, Crisófora Antonio Hernández y a mi abuelita Ofelia Antonio Hernández quienes nunca me han dejado solo, porque una madre jamás lo hace. A mis hermanos Karla Itzel y Christian David por sentir una sincera alegría con mis logros.

A mi tío, Jorge B. Morales Antonio por ser un referente de superación y por el gran apoyo y cariño que sé siempre tendré.

A mis suegros Andrea Vicente Merino y Elías López García por ser tan amables, comprensibles y todo lo bueno que se pueda decir, no creo haber podido tener unos mejores suegros. Los aprecio enormemente.

A mi cuñada Raquel Jared López Vicente, por todas las curiosidades que ya ha preparado para su sobrina y por todo el cariño que desde ahora demuestra por ella. Por apoyar a tu hermana y a mí cuando has podido y a mano abierta, muchas gracias.

A Alejandro Cruz Hernández por las charlas interminables, por apoyarme, por creer en mis proyectos y por ser un referente de humildad y sencillez. A Marlen Gómez Montalvo por ser una buena consejera y buena amiga. A Lizeth Núñez López por la amistad sincera. A Clemente Fernando Márquez por el entusiasmo de tu amistad desinteresada. A Nancy Cruz Velasco por estos años de compañerismo y amistad, sigue superándote, no abandones tus metas.

A mis compañeras de laboratorio Nohemí Gabriela Cortés López, Sarahí del Carmen Hernández Heredia y Teresa Nohemí Torres Pérez por la confianza, amistad, apoyo brindado.

Al Eterno por disciplinarme y permitirme recomponer el camino.

Y aunque es poco común, creo que todos deberían agradecerse a sí mismos porque hacemos un gran esfuerzo dando lo mejor de nosotros en clases, en el laboratorio, en las presentaciones, en las estancias, en los congresos, en los artículos, etc., sacrificando tiempo con los hijos, pareja, familia y demás, así que gracias a mí.

Durante los más de 15 semestres que estuve en esta universidad todos los días al salir veía estas palabras y aunque sabía el significado no lo comprendía...hasta ahora.

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

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	12
ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
LISTA DE ABREVIACIONES .....	14
RESUMEN .....	16
SUMMARY .....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
CAPÍTULO I.....	20
1. Generalidades .....	20
1.1. Fuentes de $\alpha$ -amilasas.....	20
1.2. Las $\alpha$ -amilasas y sus aplicaciones .....	20
1.3. Organización estructural de las $\alpha$ -amilasas .....	22
1.3.1. El domino de unión a almidón (SBD) .....	25
1.4. Mecanismo de reacción de las $\alpha$ -amilasas.....	26
1.5. La $\alpha$ -amilasa AmiJ33 de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M .....	27
1.6. Producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i> .....	28
1.7. Modificaciones estructurales del almidón que favorecen la hidrólisis enzimática ...	31
1.7.1. Gelatinización del almidón.....	33
1.7.2. Hidrólisis ácida del almidón.....	33
CAPÍTULO II.....	35
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	35
2.2 HIPÓTESIS .....	35
2.3 OBJETIVOS.....	35
2.3.1 Objetivo general .....	35
2.3.2 Objetivos particulares .....	35
CAPÍTULO III .....	36
3. METODOLOGÍA.....	36
3.1. Material biológico .....	36
3.2. Medios y condiciones de cultivo .....	36
3.3. Estrategia para la obtención del gen <i>amiJ33</i> .....	37
3.3.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados .....	37
3.4. PCR y clonación del producto de PCR.....	38
3.5. Extracción y purificación de ADN genómico de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M.....	39
3.6. Secuenciación .....	39

3.7. Búsqueda <i>in silico</i> del gen <i>amiJ33</i> en el genoma de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	40
3.8. Clonación de <i>amiJ33</i>	40
3.9. Electroforesis de ADN	40
3.10. Preparación de células electrocompetentes	41
3.11. Transformación de <i>E. coli</i>	41
3.12. Escrutinio de células transformadas	42
3.13. Escrutinio de clonas por patrón de restricción	42
3.14. Caracterización molecular de <i>amiJ33</i>	42
3.15. Técnicas enzimáticas y bioquímicas	43
3.15.1. Ensayo de actividad enzimática en caja	43
3.15.2. Sobreexpresión de <i>amiJ33</i>	43
3.15.3. Purificación de AmiJ33r	44
3.15.3.1. Precipitación de AmiJ33r con sulfato de amonio	44
3.15.3.2. Purificación de AmiJ33r por cromatografía de afinidad	44
3.16. Electroforesis de proteínas	45
3.17. Zimograma	45
3.18. Caracterización bioquímica de AmiJ33r	46
3.18.1. Determinación del efecto del pH y estabilidad de la actividad respecto al pH	46
3.18.2. Determinación del efecto de la temperatura y estabilidad térmica de AmiJ33r	46
3.18.3. Efecto de agentes iónicos, quelantes y surfactantes sobre la actividad de AmiJ33r	47
3.18.4. Determinación de los parámetros cinéticos	48
CAPÍTULO IV	49
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Aislamiento del gen <i>amiJ33</i> de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M	49
4.2. Amplificación de <i>amiJ33</i>	49
4.3. Análisis molecular y secuencia aminoacídica de AmiJ33r	50
4.3.1. El péptido señal	54
4.3.2. Dominio A	55
4.3.3. Dominio C	55
4.3.4. Región extra	56
4.4. Expresión de <i>amiJ33</i> en <i>E. coli</i>	61
4.5. Purificación de AmiJ33r	62
4.6. Caracterización bioquímica de AmiJ33r	64
4.6.1. Efecto del pH en la actividad de AmiJ33r	65

4.6.2. Efecto del pH en la estabilidad de AmiJ33r .....	66
4.6.3. Efecto de la temperatura en la actividad y termoestabilidad de AmiJ33r .....	67
4.6.4. Efecto de iones en la actividad de AmiJ33r .....	69
4.6.5. Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33r .....	71
CONCLUSIONES .....	73
PERSPECTIVAS .....	75
REFERENCIAS .....	76
ANEXO I .....	82
ANEXO II .....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localización del SBD en algunas enzimas.....	26
Tabla 2. Composición del medio YENB.....	36
Tabla 3. Composición del medio LB.....	37
Tabla 4. Fuentes de los genes de $\alpha$ -amilasas seleccionados.....	37
Tabla 5. Oligonucleótidos degenerados. ....	38
Tabla 6. Componentes de PCR.....	38
Tabla 7. Condiciones de PCR.....	38
Tabla 8. Oligonucleótidos FpBAD y RpBAD.....	39
Tabla 9. Tipos de aminoácidos presentes en la región extra. ....	57
Tabla 10. Purificación de AmiJ33r.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de las $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio. ....	22
Figura 2. Estructura 3D de una $\alpha$ -amilasa de peso molecular promedio: AmyK38.....	23
Figura 3. Regiones conservadas de las $\alpha$ -amilasas.....	24
Figura 4. Multialineamiento del SBD de enzimas amilolíticas.....	25
Figura 5. Mecanismo de hidrólisis de las $\alpha$ -amilasas.....	27
Figura 6. Morfología de los gránulos de almidón de maíz (M) y trigo (T). ....	31
Figura 7. Estructura interna del gránulo de almidón. ....	32
Figura 8. Representación gráfica de los oligonucleótidos degenerados.....	49
Figura 9. Representación gráfica de AmiJ33r. ....	54
Figura 10. Multialineamiento del péptido señal de AmiJ33r. ....	54
Figura 11. Multialineamiento del SBD de AmiJ33r.....	56
Figura 12. Árbol filogenético de AmiJ33r.....	58
Figura 13. Multialineamiento de AmiJ33r. ....	60
Figura 14. Estructura 3D homóloga de AmiJ33r.....	61
Figura 15. Prueba de actividad $\alpha$ -amilasa en caja. ....	62
Figura 16. SDS PAGE de AmiJ33r purificada. ....	63

Figura 17. Zimograma en condiciones nativas de AmiJ33r y AmiJ33. ....	64
Figura 18. Efecto de pH en la actividad de AmiJ33 y AmiJ33r. ....	65
Figura 19. Estabilidad de la actividad de AmiJ33r y AmiJ33 respecto al pH. ....	66
Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad de AmiJ33 y AmiJ33r. ....	67
Figura 21. Termoestabilidad de AmiJ33r. ....	68
Figura 22. Efecto de agentes iónicos, quelantes y desnaturalizantes sobre la actividad de AmiJ33r. ....	69
Figura 23. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33r. ....	72

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>AMFEP</b>	Asociación de Fabricantes y Formuladores de Productos Enzimáticos
<b><i>amiJ33</i></b>	Gen de la $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JJC33M
<b>AmiJ33</b>	$\alpha$ -amilasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M
<b>AmiJ33r</b>	$\alpha$ -amilasa recombinante de <i>B. amyloliquefaciens</i> JJC33M
<b><math>\beta</math>-ME</b>	$\beta$ -Mercaptoetanol
<b>CAZy</b>	Enzimas Carbohidrato-activas
<b>CBM</b>	Módulos de Unión a Carbohidratos
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>FWD</b>	Adelante
<b>FWD1-REV1</b>	Oligonucleótidos Forward 1-Reverse 1
<b>FWD2-REV2</b>	Oligonucleótidos Forward 2-Reverse 2
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Drogas
<b>GRAS</b>	Generalmente Reconocida Como Segura
<b>I</b>	Iodo
<b>JTT</b>	Modelo Jones-Taylor-Thornton
<b>KI</b>	Ioduro de Potasio
<b>LB</b>	Lauria-Bertani
<b>MWCO</b>	Corte de Peso Molecular
<b>nt</b>	nucleótidos
<b>ORF</b>	Marco Abierto de Lectura
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RBS</b>	Sitio de Unión al Ribosoma
<b>REV</b>	Reverso
<b>SBD</b>	Dominio de Unión al Almidón
<b>SBX</b>	Sacarosa, azul de Bromofenol, azul de Xileno
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de amonio
<b>SOC</b>	Medio Súper Óptimo con represor Catabólico
<b>SRP</b>	Partícula de reconocimiento de señal

<b>TAE</b>	Tris, ácido Acético, EDTA
<b>TIM-barrel</b>	Barril de la Triosafosfato isomerasa
<b>Tm</b>	Temperatura de alineamiento

## RESUMEN

En el presente trabajo el gen que codifica para la  $\alpha$ -amilasa AmiJ33, de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, se aisló, clonó y expresó heterológamente en *Escherichia coli*. El análisis *in silico* de la secuencia peptídica de AmiJ33r predijo una proteína de 659 aminoácidos con un peso molecular de 72kDa (22kDa más que AmiJ33 nativa) y mostró una estrecha relación filogenética con  $\alpha$ -amilasas de *B. amyloliquefaciens* sp., plantarum. En comparación con otras enzimas recombinantes AmiJ33r fue exportada al medio extracelular y mostró características bioquímicas distintas a AmiJ33 nativa. AmiJ33r sólo fue capaz de hidrolizar almidón gelatinizado, mientras que AmiJ33 hidroliza tanto almidón nativo como gelatinizado. Se requirió una mayor concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para precipitar AmiJ33r (80%), en comparación con el 60% usado para precipitar AmiJ33 debido a que la región extra del C-terminal es rica en aminoácidos hidrofílicos. Con respecto al efecto del pH en la actividad, AmiJ33r mostró un perfil de actividad distinto al de AmiJ33. AmiJ33r presentó un pH óptimo a 9, mientras que AmiJ33 tiene un pH óptimo a 5. En cuanto a la estabilidad de la actividad con respecto al pH, AmiJ33r mostró su máxima actividad a pH 5 y 7 y mostró ser menos estable que AmiJ33 a pHs ligeramente ácidos (pH 4). Al evaluar el efecto de temperatura en la actividad AmiJ33r mostró un perfil parecido al de AmiJ33, presentando una temperatura óptima a 80°C. Asimismo, AmiJ33r presentó un perfil de termoestabilidad similar a AmiJ33, mostrando una vida media de 23h, 4.4h y 17.4min a 40, 50 y 60°C respectivamente. La actividad de AmiJ33r se incrementó 22% con  $\text{Mn}^{2+}$  (5mM) y 18% con  $\text{Ca}^{2+}$  (10mM). Sorprendentemente AmiJ33r mostró el 60% de actividad en presencia de SDS al 1% (v/v) mientras que, en las mismas condiciones, la actividad de AmiJ33 se inhibió. La actividad de ambas enzimas se inhibió en presencia de 1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol.

La evidencia sugiere que los aminoácidos de la región extra del C-terminal de AmiJ33r promueven que la enzima presente mayor actividad a pHs alcalinos y eliminan la capacidad de AmiJ33r para hidrolizar almidón nativo.

## SUMMARY

In the present work, the gene encoding for  $\alpha$ -amylase, AmiJ33, from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, was isolated, cloned and expressed in *Escherichia coli*. The peptide sequence of AmiJ33r was analyzed *in silico*. AmiJ33r is a protein of 659 aminoacids with a molecular weight of 72 kDa (22 kDa more than AmiJ33 native). AmiJ33r have a close phylogenetic relationship with  $\alpha$ -amylases from *B. amyloliquefaciens* sp., plantarum. Compared to other recombinant enzymes, AmiJ33r was exported into the extracellular medium and showed different biochemical characteristics to AmiJ33. AmiJ33r only hydrolyze gelatinized starch, while AmiJ33 hydrolyzed both native starch and gelatinized starch. A higher concentration of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was required to precipitate AmiJ33r (80%), compared with 60% used to precipitate AmiJ33. Regarding the effect of pH on the activity, AmiJ33r showed a different profile from AmiJ33. AmiJ33r presented optimum pH at 9 while AmiJ33 has an optimum pH at 5. As to the stability of the activity at pH, AmiJ33r showed maximum activity at pH 5 and 7 and shown to be less stable at pH slightly acidic (pH 4) than AmiJ33. To evaluate the effect of temperature on the activity, AmiJ33r and AmiJ33 showed similar profile and presented an optimum temperature at 80°C. Also AmiJ33 presented a similar thermostability profile to AmiJ33r. Half-life of AmiJ33 at 40, 50 and 60°C was 23h, 4.4h and 17.4min, respectively. AmiJ33r activity was increased 22% with  $\text{Mn}^{2+}$  (5mM) and 18% with  $\text{Ca}^{2+}$  (10mM). Surprisingly, AmiJ33r showed 60% of activity in the presence of 1% SDS (v/v) while, under the same conditions, the AmiJ33 activity was inhibited. The activity of both enzymes were inhibited with 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol.

Evidence suggests that extra region from C-terminal of AmiJ33r is responsible for biochemical differences observed between AmiJ33 and AmiJ33r, and probably is also responsible for the capacity loss of AmiJ33r to hydrolyze native starch.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores naturales de una gran variedad de reacciones químicas requeridas para la vida. Su habilidad para llevar a cabo transformaciones específicas favorece su uso en diversos procesos industriales. Alrededor de 60 enzimas diferentes son usadas en la industria, pero las más importantes son las amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, xilanasas y catalasas (<http://www.amfep.org/>). De este grupo, las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1) se consideran unas de las más importantes porque tienen aplicación en varias industrias (Li y col., 2012) debido a sus amplios intervalos de temperatura (50-100°C), de pH (5-11) (Sivaramakrishnan y col., 2006) y gran variedad de productos que generan. Debido a que las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan el enlace glucosídico  $\alpha$ -(1-4) del almidón, glucógeno y otros polisacáridos, sus aplicaciones van desde la producción de jarabes fructosados hasta la producción de ciclodextrinas para la industria farmacéutica.

Aproximadamente el 60% de las  $\alpha$ -amilasas registradas actualmente en la AMFEP (<http://www.amfep.org/>) son producidas por los microorganismos nativos. Sin embargo, la producción proteica por las fuentes nativas en la mayoría de los casos presenta varios inconvenientes, ya que éstas también secretan un gran número de enzimas hidrolíticas en el medio, incluyendo proteasas, que complican el proceso de recuperación, el procesamiento y la estabilidad de la enzima de interés (Simonen y Palva, 1993). El uso de la tecnología del ADN recombinante ha permitido incrementar los niveles de expresión de diversas enzimas, incluyendo las  $\alpha$ -amilasas. La expresión y producción a nivel industrial de enzimas recombinantes se lleva a cabo, generalmente, en bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, las cuales son consideradas como organismos GRAS por su baja cantidad de pirógenos, además de presentar otros beneficios en la expresión de enzimas recombinantes (Lara y col., 2011).

*Escherichia coli* es otro modelo para la expresión de enzimas recombinantes que provee grandes cantidades de enzima pura. Sin embargo, no todas las proteínas pueden ser secretadas de forma eficiente, y en algunos casos la sobreexpresión puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión lo cual también complica la recuperación. Por estas razones la producción a gran escala usando este sistema de expresión no es común para

enzimas recombinantes (Yamabhai y col., 2008). Aunque, debido al conocimiento genético y molecular que se tiene de *E. coli*, ésta sigue siendo un buen modelo para utilizarse a nivel laboratorio y realizar estudios preliminares de la enzima blanco.

En este trabajo se presenta la caracterización molecular del gen *amiJ33* que codifica para la  $\alpha$ -amilasa AmiJ33 de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M que incluye el aislamiento, la clonación, la expresión heteróloga de la proteína en *E. coli* y el análisis de las secuencias nucleotídica y de aminoácidos. También se presenta la caracterización bioquímica y cinética de la AmiJ33 recombinante (AmiJ33r).

# CAPÍTULO I

## 1. Generalidades

### 1.1. Fuentes de $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas producidas por plantas, animales y microorganismos, donde juegan un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos. Aunque las  $\alpha$ -amilasas se encuentran muy distribuidas en los organismos, solo las  $\alpha$ -amilasas de fuentes microbianas (hongos y bacterias) se producen industrialmente debido a ciertas ventajas como la rentabilidad, menor tiempo y espacio necesario para la producción y la facilidad de optimización y modificación de procesos (Burhan y col., 2003).

Las  $\alpha$ -amilasas de bacterias del género *Bacillus* son de las más utilizadas para satisfacer las necesidades industriales, siendo *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* las principales fuentes bacterianas productoras de estas enzimas. También se ha reportado que *B. velezensis*, *B. coagulans*, *B. acidocaldurius* (Ben y col., 1999), *Microbacterium imperiale*, y *Streptomyces violaceoruber* (<http://www.amfep.org/>) son buenas productoras de  $\alpha$ -amilasas. Por otro lado, algunos hongos filamentosos, principalmente los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* como *A. oryzae* y *A. niger* (Sivaramakrishnan y col., 2006) y *Trichoderma*, como *T. resei* y *T. longibrachiatum* (<http://www.amfep.org/>) también son explotados para la producción de  $\alpha$ -amilasas.

### 1.2. Las $\alpha$ -amilasas y sus aplicaciones

Las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1) son enzimas extracelulares que pertenecen a la familia 13 de las glucosilhidrolasas o clan GH-13. Se denominan endoenzimas porque catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos internos  $\alpha$ -(1-4) presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos (Yang y col., 2012) y como resultado se obtienen productos  $\alpha$ -anoméricos (Sivaramakrishnan y col., 2006).

Debido al amplio intervalo de operación (temperatura y pH) de las  $\alpha$ -amilasas microbianas, éstas son altamente demandadas por diversas industrias, principalmente las del sector alimentario. Por ejemplo, son usadas para generar jarabes de glucosa, fructosa y maltosa,

para clarificar jugos y disminuir la viscosidad (Li y col., 2012). En la industria panadera son usadas para degradar el almidón de las harinas y controlar el volumen, el sabor general y la textura del pan, así como para retrasar su endurecimiento (retrogradación). Las  $\alpha$ -amilasas se comercializan en forma de mezclas enzimáticas (Bakezyme®P, Bakezyme®H, Bakezyme®PS/Bakezyme PFP, Bakezyme®AG) que facilitan la manufactura del pan en sus diferentes presentaciones y para productos específicos como masas con alto contenido de proteínas o fibra (<http://dsm.ingredientsnetwork.com>).

La industria de alimentación animal usa  $\alpha$ -amilasas para predigerir el almidón presente en los granos (Li y col., 2012) con la finalidad de que los cerdos y aves de corral mejoren la digestión y absorción de nutrientes, logrando reducir los costos de alimentación (<http://www.amfep.org/>).

El campo de aplicación técnica de las  $\alpha$ -amilasas también es muy variado: en la industria textil se usan en el proceso de descolado para desalmidonar telas, reduciendo la necesidad de productos químicos agresivos. Además favorece la conservación de la resistencia de la tela y la disminución del impacto ambiental. En los detergentes se usan  $\alpha$ -amilasas para degradar las manchas de almidón en la ropa. Finalmente, en la producción de biocombustibles, son esenciales para degradar el material amiloideo a glucosa (<http://www.amfep.org/>).

En cuanto al posicionamiento de las  $\alpha$ -amilasas en el sector económico, tan solo en el año 2013 la AMFEP registró una producción mundial de 100 toneladas métricas de  $\alpha$ -amilasas nativas y recombinantes. En ese mismo año, Novozymes incrementó 3% las ventas de amilasas con respecto al año 2012, contribuyendo en el crecimiento económico de la empresa (<http://www.report2013.novozymes.com/strategy--performance/sales-and-markets>). Por otro lado, se espera que la venta mundial de  $\alpha$ -amilasas incremente significativamente en este año (2015) debido a la demanda que se tiene de la enzima en el sector de alimentación animal (<http://www.frost.com/sublib/display-market-insight.do?id=115387658>). Así mismo, la creciente demanda de combustibles alternativos como el bioetanol ha favorecido la producción y venta de  $\alpha$ -amilasas (<http://www.amfep.org/content/technical>). Se estima que las ventas de enzimas para la

producción de bioetanol serán de \$1.5 billones de dólares en el presente año (2015) y que las  $\alpha$ -amilasas serán las enzimas más demandadas (Li y col., 2012).

### 1.3. Organización estructural de las $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas bacterianas del género *Bacillus* presentan pesos moleculares muy variados de entre 27 y 77kDa (Abdu y col., 2011; Quintero y col., 2010). Sin embargo, las más comunes tienen pesos moleculares entre 48 y 58kDa y tienen en promedio 500 aminoácidos. A partir del análisis de la estructura primaria de éstas últimas se observan tres regiones: el péptido señal, el dominio A que contiene un dominio interno denominado dominio B, y el dominio C o dominio C-terminal (fig. 1).

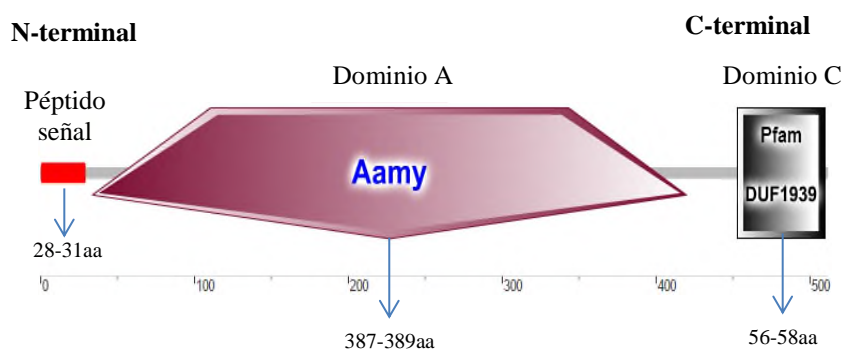


Figura 1. Representación gráfica de las  $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio.

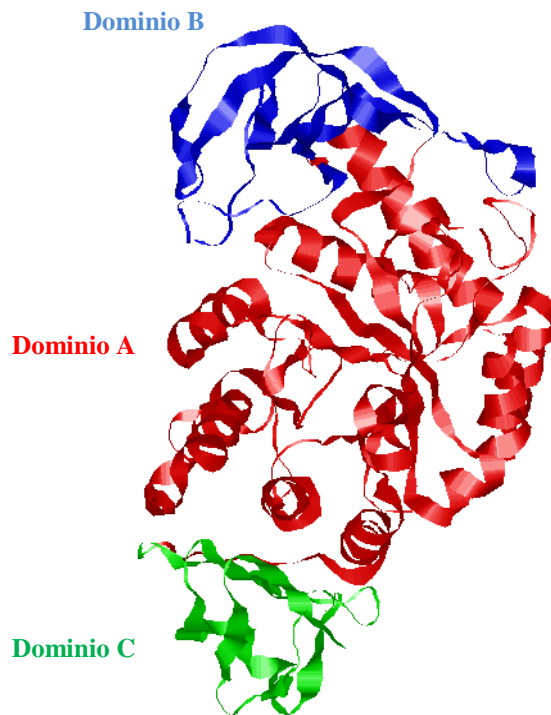
No todas las  $\alpha$ -amilasas poseen las regiones descritas, por ejemplo, las  $\alpha$ -amilasas producidas por *B. cereus*, que son las de menor peso molecular (27kDa) reportadas hasta el momento, no poseen péptido señal, ni dominio C. Aunque estas  $\alpha$ -amilasas si cuentan con un dominio transmembranal de 22 aminoácidos ubicado en el C-terminal, y un dominio A de 269 aminoácidos.

Las  $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio (48-58kDa) así como las de alto peso molecular (>70kDa), cuentan con un péptido señal de entre 28 y 33 aminoácidos que está altamente conservado entre especies. Las  $\alpha$ -amilasas de alto peso molecular poseen además una región de división (región-P) (Salimi y col., 2012) que se ubica entre el péptido señal y el dominio A. La región-P puede tener longitudes muy variadas y sirve para indicar el inicio de la enzima madura (Olivares, 2003).

El **dominio A** de las  $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio tiene entre 387 y 407 aminoácidos y está altamente conservado, contiene al dominio B que varía sustancialmente en tamaño entre  $\alpha$ -amilasas (Nielsen y col., 2000). Además, en el dominio A se localizan los aminoácidos responsables de la hidrólisis enzimática.

El **dominio C** de las  $\alpha$ -amilasas está implicado en la unión a almidón ya que posee regiones de aminoácidos muy conservados denominados SBD que permiten la unión de la enzima al almidón nativo o al insoluble.

Tridimensionalmente se observa que el dominio A presenta un plegamiento de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> o “TIM-barrel”, el dominio B se destaca entre la hoja  $\beta_3$  y la  $\alpha$  hélice<sub>4</sub>, y el dominio C consiste en un arreglo de hojas  $\beta$  unidas al dominio A (fig. 2) (Nielsen y col., 2000).



**Figura 2.** Estructura 3D de una  $\alpha$ -amilasa de peso molecular promedio: AmyK38. Protein Data Bank (PDB 1ud8).

Las  $\alpha$ -amilasas contienen otras cuatro regiones altamente conservadas involucradas con la actividad de la enzima. Tres de estas regiones se encuentran en el sitio activo. En modelos 3D, como el de AmyK38 (Nonaka y col., 2003), la primera región abarca el fin de la hoja

$\beta_3$ . Dentro del túnel que forma el “TIM-barrel” se localizan la segunda, tercera y cuarta región, en las que se encuentran los residuos catalíticos responsables de la actividad amilolítica que generalmente son dos residuos de ácido aspártico (Asp) y uno de ácido glutámico (Glu) (Nielsen y col., 2000). La segunda región que abarca parte de la hoja  $\beta_4$  contiene uno de los residuos de Asp. La tercer región, que comprende parte de la hoja  $\beta_5$  y parte del “loop” que une la hoja  $\beta_5$  con la  $\alpha$  hélice $_5$ , contiene el residuo de Glu. La cuarta región que consiste en un “loop” que une la hoja  $\beta_7$  y la  $\alpha$  hélice $_7$ , contiene un segundo residuo de Asp (fig. 3) (Horváthová y col., 2001).

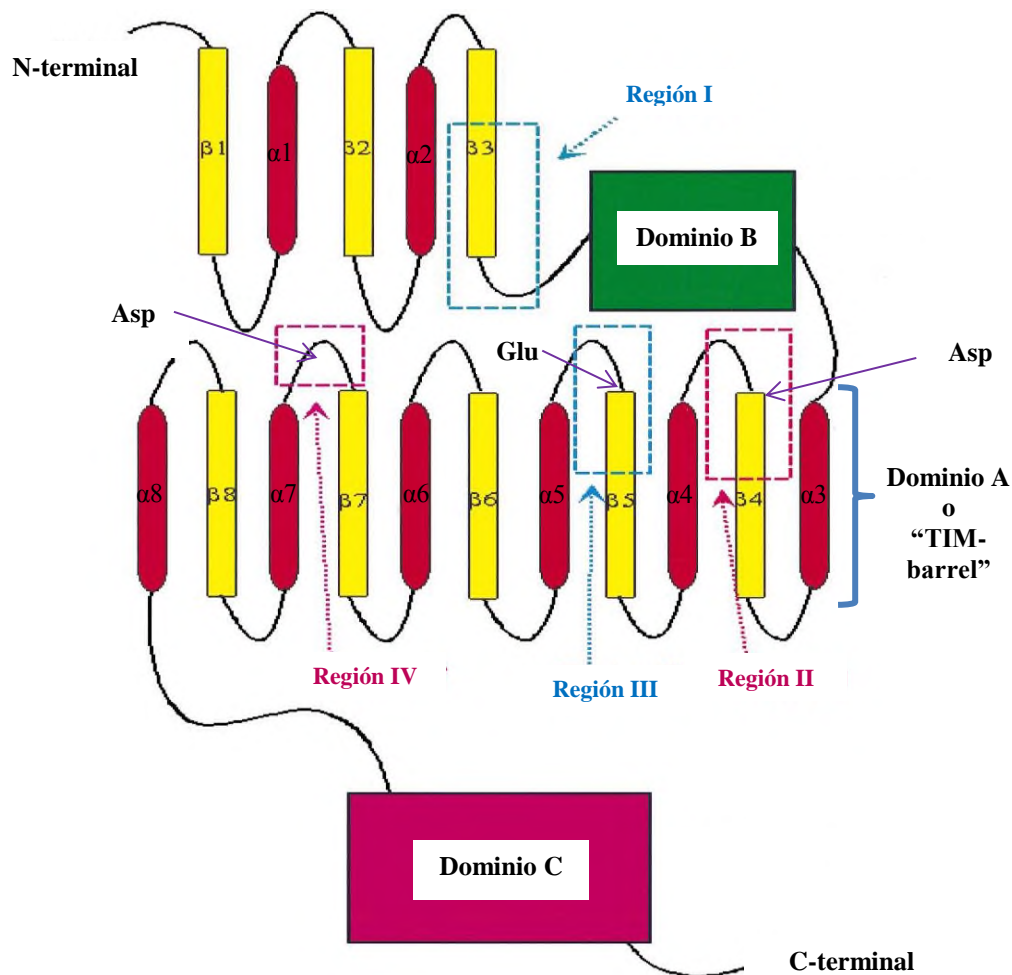
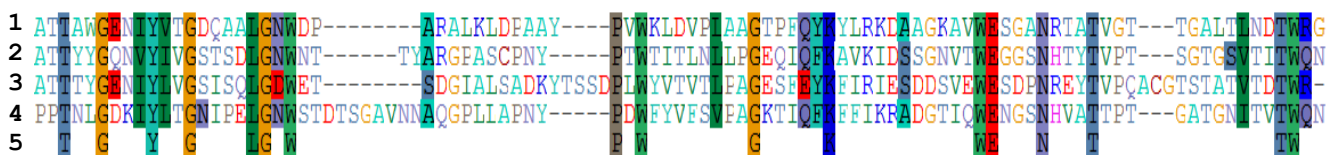


Figura 3. Regiones conservadas de las  $\alpha$ -amilasas. Tomado de Nielsen y col., 2000.

La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas conocidas también contienen  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuye a mantener la estabilidad estructural, aunque otras  $\alpha$ -amilasas suelen estabilizarse con otros iones como  $\text{Na}^+$  (Nonaka y col., 2003).

### 1.3.1. El dominio de unión a almidón (SBD)

La región auxiliar no catalítica de las  $\alpha$ -amilasas ubicada en dominio C, contiene una secuencia de aminoácidos muy conservados que tienen afinidad por el almidón (SBD, starch binding domain) (fig. 4). Esta región tiene como función principal incrementar la eficiencia catalítica de las enzimas con los sustratos insolubles, ya que es mucho más complicado hidrolizar almidón nativo que almidón gelatinizado debido al tamaño de las partículas, la insolubilidad y la estructura policristalina que varía según la fuente del almidón (Cantarel y col., 2009).



**Figura 4.** Multialineamiento del SBD de enzimas amilolíticas.

1: SBD de la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces limosus* M18244; 2: SBD de la  $\beta$ -amilasas de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* M22471; 3: SBD de la Glucoamilasa de *Aspergillus niger* X00712; 4: SBD de la  $\alpha$ -amilasa maltogénica de *Bacillus stearothersophilus* M36539; 5: Consenso de aminoácidos conservados del SBD.

El SBD se une sobre los gránulos de almidón por adsorción directa (García y col., 2012). Las principales interacciones que establecen los aminoácidos que conforman el SBD son puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de residuos aromáticos (particularmente tirosinas y triptófanos) con los anillos de piranosa del almidón (Boraston y col., 2006). Se ha visto que la eliminación de este dominio reduce e incluso nulifica la actividad de las enzimas sobre sustratos insolubles aunque la actividad sobre los sustratos solubles no es afectada (Rodríguez y col., 2000). De forma contraria, la inserción de este dominio ha aumentado la actividad de algunas enzimas (Juge y col., 2002).

Los SBD se encuentran en enzimas provenientes de bacterias, arqueas y eucariotas. Han sido clasificados en la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>) dentro de las familias CBM. Actualmente existen diez de estas familias para el clan GH-13: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48, CBM58 y CMB69. La identificación de los SBD indica que estos pueden encontrarse en el N o C-terminal de la proteína (tabla 1).

**Tabla 1.** Localización del SBD en algunas enzimas.

<b>Familia</b>	<b>Ubicación del SBD</b>	<b>Enzima, microorganismo</b>
CBM20	C-terminal	Glucamilasa, <i>Aspergillus niger</i>
CBM21	N-terminal	Glucamilasa, <i>Rhizopus oryzae</i>
CBM25	C-terminal	$\beta$ -amilasa, <i>Peanibacillus polymyxa</i>
CBM26	C-terminal	$\alpha$ -amilasa, <i>Lactobacillus manihotivorans</i>
CBM34	N-terminal	$\alpha$ -amilasa, <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
CBM41	N-terminal	Pululanasa, <i>Thermotoga maritima</i>
CBM45	N-terminal	$\alpha$ -amilasa, <i>Solanum tuberosum</i>
CBM48	C-terminal	Pululanasa, <i>Bacillus subtilis</i>
CBM58	C-terminal	$\alpha$ -amilasa, <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
CBM69	C-terminal	$\alpha$ -amilasa, bacteria no cultivable

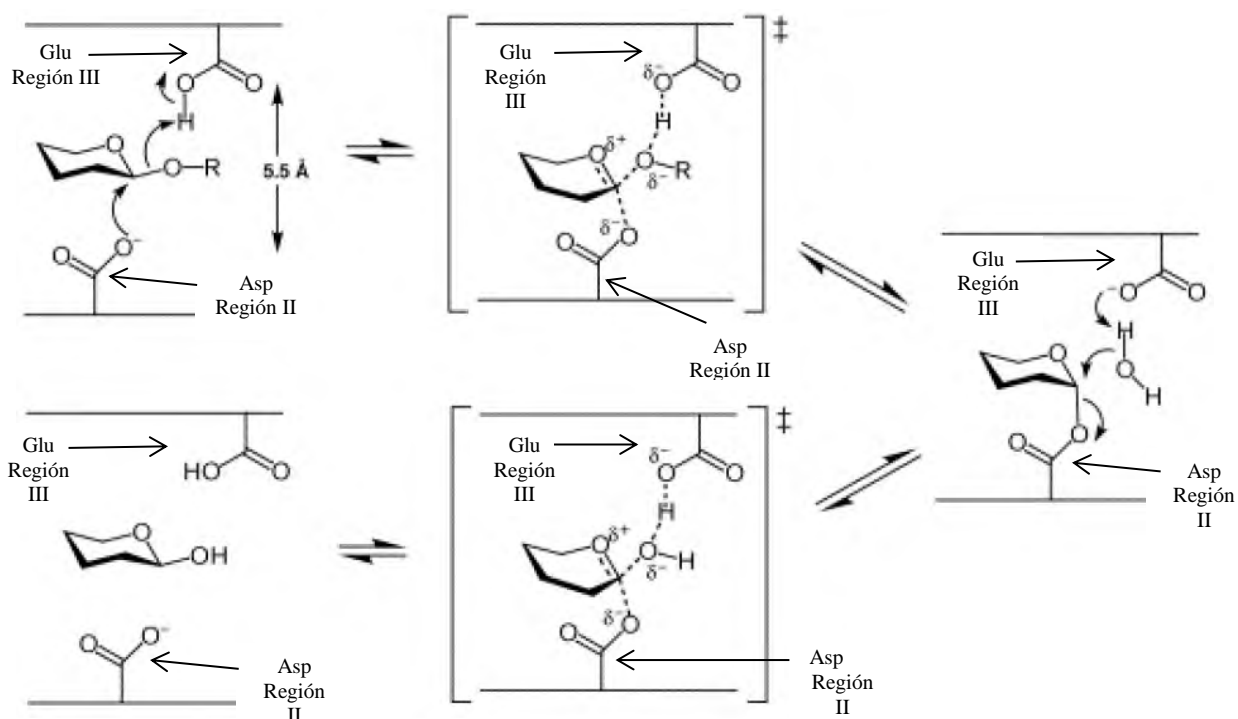
Cabe resaltar que la familia CBM48 se une a glucógeno, molécula muy semejante a la amilopectina pero con mayor grado de ramificación, lo que sugiere que los miembros de esta familia también pueden unirse al almidón.

Aunque los SBD están muy conservados y se encuentran distribuidos en bacterias, arqueas y eucariotas, no están presentes en todas las glucosilhidrolasas. Sin embargo, se ha demostrado que las secuencias de los SBD de las enzimas amilolíticas tienen más relación con su origen filogenético (fúngico o bacteriano) que con su funcionalidad.

#### **1.4. Mecanismo de reacción de las $\alpha$ -amilasas**

Todas las  $\alpha$ -amilasas tienen en común la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4), produciendo unidades  $\alpha$ -anoméricas u oligosacáridos. El mecanismo catalítico consiste en un doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$  (Van der Maarel y col., 2002) que se lleva a cabo mediante dos residuos de Asp y uno de Glu (Nielsen y col., 2000) localizados en las regiones conservadas II, III y IV. Durante este proceso, el residuo de Asp ubicado en la región II, realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico (carbono  $\alpha$ ) del sustrato, formándose de manera transitoria un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Posteriormente, el residuo de Glu de la región III actúa como ácido/base y sustrae un protón de una molécula de agua que escinde el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Polaina, 2004), liberándose así la molécula hidrolizada (fig. 5). El residuo de Asp de la región IV no juega un papel importante en el mecanismo catalítico

pero se sabe que es importante para la catálisis (Coutinho y Henrissat, 1999). Se ha propuesto que este residuo eleva el pKa del residuo de Glu de la región III por medio de interacciones electrostáticas (Knegtel y col., 1995) y también se ha demostrado que está implicado en la unión y distorsión del sustrato (Uitdehaag y col., 1999).



**Figura 5.** Mecanismo de hidrólisis de las α-amilasas.

### 1.5. La α-amilasa AmiJ33 de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M

*B. amyloliquefaciens* JJC33M es una bacteria Gram positiva que fue aislada en trabajos anteriores (Montor y col., 2014) a partir de suelos cultivados con caña de azúcar en la región Cuenca del Papaloapan. *B. amyloliquefaciens* JJC33M produce una α-amilasa (AmiJ33) de 50kDa, la cual fue purificada parcialmente por precipitación con sulfato de amonio (60% de saturación) (Montor y col., 2014).

Al evaluar el efecto del pH y T en la actividad enzimática de AmiJ33, los valores más altos se observan a pH 6.0 y 80°C respectivamente. En condiciones ligeramente ácidas (pH 4.0 y

5.0), AmiJ33 mantiene el 72% de su actividad y es estable por 3 h a 40°C, y por 30 min a 45 y 50°C, conservando el 88 y 82% de actividad respectivamente. A 60°C, la actividad disminuye al 62%. La actividad de AmiJ33 se inhibe con SDS al 10% (p/v) y se favorece por β-mercaptoetanol al 10% (v/v) (Montor y col., 2014).

Por otra parte, la presencia de iones como el  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Na^{+}$  incrementan significativamente la actividad de AmiJ33. Sin embargo AmiJ33, a diferencia de las α-amilasas producidas por otras cepas de *B. amyloliquefaciens*, no es una metaloenzima ya que el EDTA no tiene efecto en su actividad por lo que la presencia de iones  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Na^{+}$  solo la estabilizan estructuralmente (Montor y col., 2014).

Las características bioquímicas de AmiJ33 tienen aplicación algunos sectores industriales como de panificación y producción de jarabes fructosados previa sacarificación del almidón. Sin embargo, la presencia de proteínas contaminantes en el extracto crudo y sobre todo, la baja expresión de la enzima (ya que es necesario concentrarla 100 veces a partir del extracto crudo), aunadas a las características bioquímicas que presenta hacen que AmiJ33 sea una buena candidata para ser sobreexpresada en *E. coli*. Esto con la finalidad de determinar su uso potencial en alguno de los sectores mencionados y estudiar el gen que la codifica.

## **1.6. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli***

La producción de proteínas recombinantes es una de las aportaciones más importantes de la biotecnología moderna. El uso de estas proteínas se remonta a 30 años atrás por la necesidad de proveer proteínas de uso terapéutico con un abasto asegurado y calidad constantes (Lara y col., 2011). Desde entonces la clonación de genes se ha realizado y en el camino se han optimizado cada uno de los elementos involucrados en la sobreexpresión de proteínas, por ejemplo, los promotores, vectores y cepas hospederas.

Se han desarrollado sistemas de expresión basados en promotores que se necesitan para casos muy concretos, o bien, que resuelven las limitaciones económicas y técnicas de los sistemas convencionales. En este contexto, un promotor ideal tiene que ser fuertemente

regulado y debe poder inducirse mediante pequeños ajustes de las condiciones de fermentación. Uno de los promotores más estudiados es el promotor del gen *araB* del operón de la arabinosa de *Salmonella typhimurium*. Este promotor está sometido a un triplete de regulación con una represión/activación por la proteína AraC y una represión catabólica por glucosa con la proteína CRP. En ausencia de arabinosa, la proteína AraC actúa como un represor y en presencia del azúcar, la proteína AraC actúa como un activador. La activación del promotor depende de la presencia del complejo cAMP-CRP, como con  $P_{lac}$  (Perera y col., 2002).

En cuanto a los vectores, los plásmidos pUC18 y pUC19 se prepararon específicamente para la clonación y expresión de genes procariontes en *E. coli*. Contienen un origen de replicación activo en *E. coli* y un el gen *amp<sup>r</sup>* que confiere resistencia a ampicilina. Algunos vectores de expresión no contienen ningún gen de resistencia a antibiótico, por lo cual las bacterias transformadas se seleccionan ya sea por actividad enzimática o por complementación de una mutación con la cepa huésped (Olempska y col., 2006).

En algunos casos, la estrategia de clonación consiste en combinar fragmentos derivados de dos o más plásmidos, de tal forma que uno puede llevar el *cassete* de expresión, mientras que el otro lleva el marcador seleccionable (generalmente un gen de resistencia a antibiótico como *amp<sup>r</sup>*). Como resultado la célula huésped puede ser co-transformada con dos o más plásmidos (Richardson y col., 2002).

Debido a la gran demanda de las  $\alpha$ -amilasas, se han desarrollado diversas metodologías para clonar genes de diversas fuentes y para producir la enzima en grandes cantidades. Además de los plásmidos mencionados, se han empleado otros con este fin, combinándolos con cepas de *E. coli* para maximizar la producción de la enzima (Sivaramakrishnan y col., 2006) los cuales son comercializados en kits que incluyen la bacteria huésped, el plásmido, oligonucleótidos para amplificar el producto de ligación, controles y algunos amortiguadores.

Cuando se está formando una nueva proteína, la cadena polipeptídica sintetizada en la traducción no suele ser funcional, sino que requiere adoptar estructuras tridimensionales complejas y algunas veces asociarse a otros polipéptidos para manifestar su actividad normal. La adopción de esta configuración tridimensional es importante porque hace a la proteína mucho más resistente a las proteasas endógenas celulares. Durante mucho tiempo se creyó que la propia secuencia de aminoácidos del péptido dirigía su plegamiento mediante el establecimiento de distintos enlaces entre las cadenas laterales de sus residuos. Hoy se sabe que la mayoría de estos procesos requiere de proteínas llamadas chaperonas (Perera y col., 2002). *E. coli* como sistema de expresión ha sido muy usado, sobretodo en la industria farmacéutica donde la producción de proteínas recombinantes está bien establecida (Mergulhao y col., 2005). Sin embargo, en muchos casos las proteínas se producen en el citoplasma en conglomerados proteicos llamados cuerpos de inclusión. Por lo que la producción de proteínas recombinantes implica purificación y replegamiento de estas estructuras (Kakeshita y col., 2012). Para resolver este problema se han realizado numerosos estudios para la secreción de proteínas por diversas vías (Rabhi y col., 2007) ya que la producción de proteínas recombinantes solubles es relativamente más rentable y consume menos tiempo. Además ofrece varias ventajas, por ejemplo, la fácil purificación del producto, mayor rendimiento, producto sin agregados, formación de puentes disulfuro, y la posibilidad de producción en cultivo continuo (Kakeshita y col., 2012).

Para explicar cómo se lleva a cabo la secreción de proteínas en *E. coli* se han descrito diversos mecanismos. Uno de ellos explica que el paso a través de la membrana interna depende de los genes *sec* y requiere que la proteína haya sido sintetizada con determinada secuencia de aminoácidos en su región N-terminal, denominada péptido señal (Perera y col., 2002). Un péptido señal consta de una región cargada positivamente, una región hidrófoba, y una región polar que contiene un sitio de escisión específico (Rabhi y col., 2007). En bacterias Gram negativas y positivas, las proteínas extracelulares se sintetizan inicialmente como pre-proteínas con un péptido señal de entre 18 y 35 aminoácidos de longitud (Simonen y Palva, 1993). El péptido señal es reconocido por un complejo multiproteico denominado SRP. El péptido señal es removido después de pasar la membrana citoplasmática. La remoción del péptido señal es catalizada por la enzima

conocida como peptidasa señal. Todas las proteínas que contienen un péptido señal se llaman pre-proteínas para distinguirlas de las pro-proteínas a las cuales les ha sido removido la metionina de iniciación. Algunas proteínas también son proteolizadas luego de su secreción por lo que se denominan pre-pro-proteínas (<http://themedicalbiochemistrypage.org/es/protein-modifications-sp.php>).

Los péptidos señal de proteínas de bacterias del género *Bacillus* pueden ser reconocidos por la maquinaria celular de *E. coli* (Yamabhai y col., 2008), exportando eficientemente las proteínas al medio celular sin necesidad de algún elemento extra. Sin embargo, aunque aún no se comprende lo que define el “estado competente” de una proteína para su exportación, se sospecha que tanto la estructura tridimensional (Perera y col., 2002) como el péptido señal tienen gran importancia en la excreción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Yamabhai y col., 2008).

### 1.7. Modificaciones estructurales del almidón que favorecen la hidrólisis enzimática

Probablemente el almidón es el polisacárido más ampliamente utilizado por el hombre; su uso se favorece por su abundancia en la naturaleza. El ser humano lo aprovecha como fuente de energía proveniente de los alimentos y como materia prima en industrias como la alimentaria, de pegamentos, de endulzantes y de etanol, entre muchas otras (García y col., 2012).

El almidón es un polímero de glucosa que se encuentra en forma de pequeños gránulos densos cuyo tamaño y morfología varía dependiendo de su origen (fig. 6). Los gránulos de almidón más grandes están presentes en la papa (15 a 100 $\mu$ m) (Lineback, 1984) y los más pequeños en el amaranto (0.8 a 2.5 $\mu$ m) (Paredes y col., 1994).

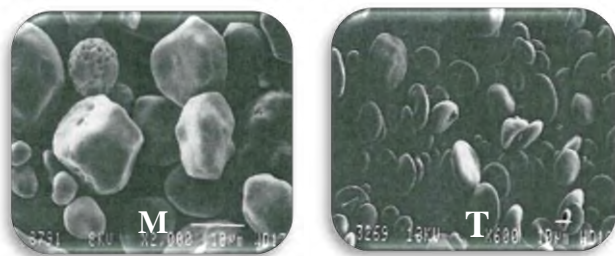
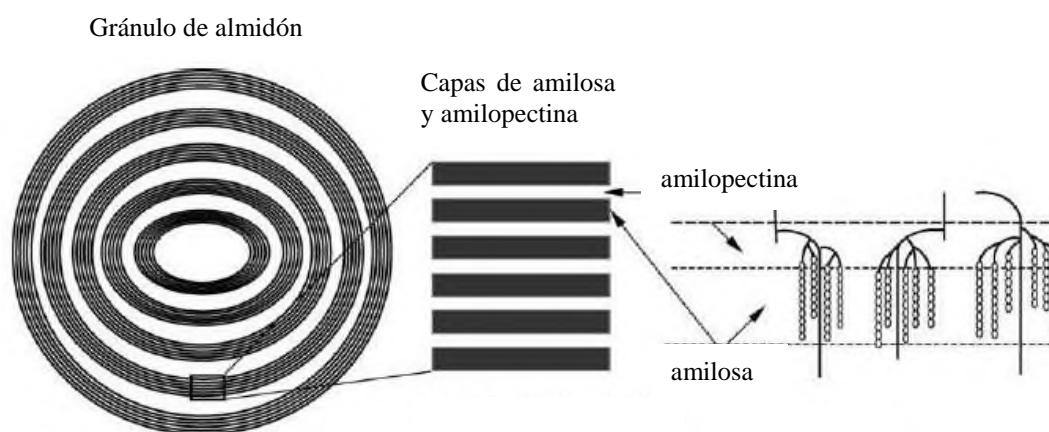


Figura 6. Morfología de los gránulos de almidón de maíz (M) y trigo (T).

Químicamente el almidón está constituido por dos moléculas de amilosa, un polisacárido lineal de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) y por una molécula de amilopectina. Esta última además de una estructura lineal tiene una estructura ramificada de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,6). Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría debido a que la amilopectina y la amilosa están muy próximas y se encuentran organizadas en capas alternas semicristalinas que forman anillos radiales de crecimiento (fig. 7) (García y col., 2012).



**Figura 7.** Estructura interna del gránulo de almidón. Modificado de Tester y col., 2004.

Los gránulos de almidón nativo muestran ser resistentes a la hidrólisis enzimática. Se ha propuesto que la resistencia a la hidrólisis enzimática está influenciada por factores como la superficie lisa del gránulo, el grado y tipo de cristalinidad. Los almidones nativos tienen un intervalo de cristalinidad de entre 15 y 45% (Zobel, 1988). Cuando se analizan por difracción de rayos X producen tres tipos principales de patrones espectrales: A (almidones de cereales), B (almidones de tubérculos) y C (almidones de leguminosas) (Imberty y Pérez 1988). En general, los almidones con patrones de difracción de tipo B y C presentan mayor resistencia a la hidrólisis enzimática debido al arreglo cristalino de las cadenas de amilopectina (Betancur, 2001).

Algunos procedimientos como el aumento de temperatura o ajuste del pH pueden influir en la pérdida de cristalinidad de los gránulos de almidón, volviéndolos menos resistentes a la hidrólisis enzimática (Vaclavick, 2002).

### **1.7.1. Gelatinización del almidón**

Los gránulos de almidón forman una suspensión temporal cuando se agitan en agua y pueden hincharse a medida que la absorben, este proceso es reversible. Sin embargo, una vez que el almidón se cuece, el hinchamiento es irreversible. Cuando se calienta el almidón, la incorporación de agua se produce primero en las áreas menos densas y posteriormente, en las regiones más cristalinas de la molécula de almidón. A medida que el calentamiento continúa, los gránulos de almidón captan más agua y se rompen parcialmente. Como resultado, algunas cadenas cortas de amilosa salen de los gránulos dispersándose en el seno de la solución. Este proceso es llamado gelatinización, durante el cual la estructura cristalina del almidón se pierde (Vaclavick, 2002).

El intervalo de temperatura a la que los diversos almidones gelatinizan es específico para cada tipo, suele iniciar entre los 60 y 71°C y terminar entre los 88 y 95°C (Vaclavick, 2002).

Las endoenzimas como las  $\alpha$ -amilasas actúan en cualquier punto del almidón (Vaclavick, 2002) pero les es más fácil hidrolizar almidón gelatinizado debido a que la amilosa está más disponible.

### **1.7.2. Hidrólisis ácida del almidón**

La hidrólisis ácida del almidón fue efectuada por primera vez en 1811 por el ruso Kirchoff y se empezó a aplicar comercialmente en 1842. Los ácidos más usados para la hidrólisis del almidón son HCl, HNO<sub>3</sub> o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La concentración del ácido, el pH, la temperatura y el tiempo de hidrólisis son los parámetros de los cuales depende el grado de degradación. Generalmente, mientras se lleva a cabo la hidrólisis debe mantenerse un pH de 1.5 y a una temperatura entre 50 y 60°C. Antes de llevar a cabo la hidrólisis, el almidón debe ser sometido a gelatinización o retrogradación debido a que en estado nativo también posee resistencia a ácidos (<http://www.cadenahortofruticola.org>).

Con el paso del tiempo la hidrólisis ácida del almidón cayó en desuso debido a causas técnicas indeseables como poco control de la reacción, baja especificidad de los productos obtenidos, generación de colores por subproductos de oxidación y presencia de sabores indeseables (García y col., 2004). En 1940, un proceso dual ácido-enzimático fue patentado, con el fin de solucionar los problemas técnicos de la hidrólisis ácida. Consiste básicamente en una prehidrólisis del almidón con HCl, posteriormente se ajusta el pH con álcalis para que la enzima trabaje adecuadamente y lleve a cabo la licuefacción (con  $\alpha$ -amilasas) y posteriormente la sacarificación (con glucoamilasas) (Whistler y col., 1984).

## CAPÍTULO II

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a la amplia aplicación e importancia económica que tienen las  $\alpha$ -amilasas, este trabajo propone estudiar la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M usando *E. coli* como sistema de expresión con la finalidad de profundizar en el conocimiento de su comportamiento bioquímico, enzimático y molecular.

### 2.2 HIPÓTESIS

El gen completo de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (*amiJ33*) puede ser clonado y expresado en *E. coli*, demostrando su funcionalidad.

### 2.3 OBJETIVOS

#### 2.3.1 Objetivo general

Aislar, clonar, analizar y expresar *amiJ33* en *E. coli* y caracterizar bioquímica y enzimáticamente la enzima recombinante.

#### 2.3.2 Objetivos particulares

- Aislar el gen *amiJ33* mediante dos estrategias moleculares: diseño de oligonucleótidos degenerados y secuenciación del ADN genómico de *B. amyloliquefaciens* JJC33M.
- Analizar molecularmente el gen *amiJ33* y la estructura primaria de AmiJ33.
- Clonar y expresar *amiJ33* en *E. coli*.
- Estudiar los comportamientos bioquímico y enzimático de AmiJ33r y compararlos con los de la enzima nativa.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Material biológico

*B. amyloliquefaciens* JJC33M se obtuvo de una colección de cepas aisladas de suelos cultivados con caña de azúcar (Montor y col., 2013).

*E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 fueron utilizadas para las clonaciones realizadas en este estudio. Los genotipos respectivos de estas cepas son: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda^-$  y F- dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda^S$ ).

#### 3.2. Medios y condiciones de cultivo

*B. amyloliquefaciens* JJC33M se creció a 37°C, 180rpm, por 24h, en medio YENB (tabla 2).

**Tabla 2.** Composición del medio YENB.

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	7.5
Caldo nutritivo	8.0

*E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 se crecieron a 37°C, 180rpm, por 16h, en medio LB (tabla 3). Al medio se le adicionó 100 $\mu$ g/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 3.** Composición del medio LB.

Componente	Concentración (g/l)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

### 3.3. Estrategia para la obtención del gen *amiJ33*

#### 3.3.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados

Con base en la relación filogenética de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor y col., 2014), se eligieron secuencias de genes de  $\alpha$ -amilasas de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Mediante multialineamientos se crearon grupos de secuencias y se eligieron aquellos con mayor número de secuencias y mejor alineadas (tabla 4). Con estos grupos se obtuvieron diversos oligonucleótidos degenerados mediante el programa primers4clades (maya.ccg.unam.mx) (tabla 5).

**Tabla 4.** Fuentes de los genes de  $\alpha$ -amilasas seleccionados.

GRUPO 1		
Fuente	Clave	Longitud(n)
<i>B. licheniformis</i>	AF438149.1	1539
<i>B. licheniformis</i>	JX897677.1	1539
<i>B. licheniformis</i>	AY630336.1	1539
<i>B. licheniformis</i>	FJ556804.1	1539
<i>B. licheniformis</i>	E01158.1	1536
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GU591658.1	1545
<i>B. amyloliquefaciens</i>	JQ710747.1	1542
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GU393359.1	1545
GRUPO 2		
Fuente	Clave	Longitud
<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC800929.1	1980
<i>B. subtilis</i>	KC113313.1	1980
<i>B. subtilis</i>	JQ768415.1	1983
<i>B. subtilis</i>	KC442295.2	1980
<i>B. subtilis</i>	FJ643607.1	1980
<i>B. subtilis</i>	AY594351.1	1980

**Tabla 5.** Oligonucleótidos degenerados.

<b>Secuencias</b>	<b>Longitud (nt)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
Grupo 1:		
<b>FWD1:</b> TGG SAC GCT GAT GCA RTA TTT TGA RTG G	28	62.6
<b>REV1:</b> YCG TTT ACR KKR AAV YYY YCC CAG CCK TC	29	66.1
Grupo 2:		
<b>FWD2:</b> GCT GAA ACK GCD MAC AAA TCR AAT GAG STK AC	32	59.2
<b>REV2:</b> AGT YRT TAT AYA AAC CAT TYW GCA CRT AAT CAA A	34	53.5
K= G o T; R= A o G; M: A o C; Y= C o T		

### 3.4. PCR y clonación del producto de PCR

*AmiJ33* se amplificó por PCR usando en la reacción las concentraciones mencionadas en la tabla 6 con los oligonucleótidos diseñados (tabla 5). Las condiciones de amplificación utilizadas se indican en la tabla 7.

**Tabla 6.** Componentes de PCR.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
H <sub>2</sub> O	39.3
10x Taq Buffer	5
dNTP Mix 10mM	1
MgCl <sub>2</sub> 50mM	3
Oligonucleótido FWD 10µM	0.5
Oligonucleótido REV 10µM	0.5
ADN (9µg/µl)	0.5
DNA Taq platinum polymerase 1U/µl (Invitrogen)	0.2

**Tabla 7.** Condiciones de PCR.

<b>No. De ciclos</b>	<b>Etapas</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>T (°C)</b>
1	Desnaturalización	2	94
30	Desnaturalización	0.5	94
1	Alineamiento	0.5	56
	Extensión	2	72
	Extensión final	5	72

El producto de PCR obtenido se purificó con el kit GeneJET PCR purification (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del proveedor, eluyendo con agua inyectable estéril. El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos degenerados se clonó en el plásmido pCR-XL-TOPO®vector (Invitrogen) usando 2µl de producto de PCR purificado

(40ng/μl, máxima concentración indicada) y 0.5μl de vector. La reacción se incubó por 25min a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 0.5μl de 6X TOPO® Cloning Stop Solution.

### 3.5. Extracción y purificación de ADN genómico de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

Las células de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se crecieron en 10ml de medio YENB estéril en las condiciones descritas. Posteriormente con ese cultivo se inoculó al 10% (v/v) una fermentación de 50ml en un matraz de 250ml y se incubó (Excella E24 Incubator, New Brunswick Scientific) en las condiciones descritas. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5500rpm por 15min (HERAEUS Pico 17 Centrifuge, Thermo SCIENTIFIC). El ADN genómico se obtuvo con el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH), siguiendo las especificaciones del proveedor. Posteriormente, se purificó usando el kit Genomic DNA Clean and Concentrator (ZYMO RESEARCH), siguiendo las especificaciones del proveedor y eluyendo con agua inyectable estéril. Se obtuvo una concentración final de ADN de 9μg/ml con una pureza de 1.8 (relación 260/280), y con las características adecuadas para ser secuenciado y para aislar el gen *amiJ33*.

### 3.6. Secuenciación

El genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M fue secuenciado por MacroGen Inc. usando la tecnología de Illumina.

La clona del gen completo de *amiJ33* también fue secuenciado por MacroGen Inc, mientras que la clona del gen maduro (*amiJ33\_SD*) fue secuenciado por la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del instituto de biotecnología de la UNAM. Se usaron los oligonucleótidos FpBAD y RpBAD (tabla 8).

**Tabla 8.** Oligonucleótidos FpBAD y RpBAD.

Secuencias	Longitud (nt)	Tm (°C)
<b>FpBAD:</b> ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC	20	59.7
<b>RpBAD:</b> GAT TTA ATC TGT ATC AGG	18	56.9

### 3.7. Búsqueda *in silico* del gen *amiJ33* en el genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

A partir de la secuencia del genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor y col., 2015) se identificó el gen de la  $\alpha$ -amilasa (*amiJ33*) desde el péptido señal hasta el codón de paro. Así mismo se identificó un promotor putativo con el programa *Neural Network Promoter Prediction* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). *AmiJ33* fue analizado por *BLAST* (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y traducido en el servidor *ExpASY* (<http://www.expasy.org/>). El ORF se confirmó con el programa *ORF Finder* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/rest\\_map.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html)).

### 3.8. Clonación de *amiJ33*

Para la clonación del gen completo *amiJ33* se usó el par de oligonucleótidos FpBT-RpBT (**FpBT**: GCC CTG CAG TTT GAA AAA CGA TTC; **RpBT**: GGG TCT AGA ATG CCG AAG ATA GC) para amplificar por PCR desde el inicio del péptido señal hasta el codón de paro. Se usaron las condiciones indicadas en la tabla 6. El producto de PCR se purificó con el kit GeneJET PCR purification (Thermo Scientific) y se clonó en el plásmido pBAD TOPO® (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se usaron 4 $\mu$ l de producto de PCR purificado (40ng/ $\mu$ l) y 0.5 $\mu$ l de vector ya que no se indicaba ninguna relación molar en el manual.

Debido al diseño de clonación en el plásmido pBAD TOPO, al producto de expresión se le agregan 17 aminoácidos en el N-terminal y 31 aminoácidos en el C-terminal, estos últimos incluyen la cola de histidinas, por lo que el peso total estimado de la proteína aumenta 5kDa.

### 3.9. Electroforesis de ADN

El material genético se verificó por electroforesis de agarosa. Se cargaron 2 $\mu$ l de ADN (genómico, producto de PCR o plásmido) mezclado con 1 $\mu$ l de SBX 6X en un gel de agarosa 0.8% (p/v). Se usó como amortiguador de corrida TAE 1X. Las muestras se corrieron a voltaje constante de 100V, de 30 a 40min (MINI SUB® CELL GT BIO-RAD). Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub> (bromuro de

etidio) 0.5µg/ml por 20-30min (Bej y col., 1991) y se lavó con agua destilada por 30min, posteriormente se observó en el equipo de fotodocumentación (SYNGENE Ingenius LHR) mediante el programa GeneSnap.

### **3.10. Preparación de células electrocompetentes**

Las células de *E. coli* TOP10 se crecieron en 10ml de medio YENB estéril. El cultivo se incubó a 37°C, 180rpm, durante 16h. Posteriormente, se usaron 5ml de ese cultivo para inocular al 10% otros 500ml de medio YENB estéril. Se monitoreó la DO<sub>600nm</sub> de este cultivo hasta alcanzar 0.5 unidades (fase exponencial de crecimiento). El cultivo se centrifugó a 5500rpm a 4°C durante 15min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 500ml de agua destilada estéril previamente enfriada, recuperando las células por centrifugación a 5500rpm a 4°C durante 15min. Este paso de lavado se repitió 2 veces más con 250ml de agua destilada estéril previamente enfriada para eliminar la presencia de sales.

Al término del tercer lavado, las células se resuspendieron en 30ml de glicerol 10% (preparado con agua destilada estéril previamente enfriada) y se centrifugaron a 5500rpm a 4°C durante 15min. El sobrenadante se descartó y las células se alicuotaron en volúmenes de 50µl en tubos de 600µl estériles, almacenándolas a -80°C hasta su uso.

### **3.11. Transformación de *E. coli***

Se agregaron 2µl de producto de ligación a 50µl de células de *E.coli* TOP10, la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación de 0.1mm 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 500µl de medio SOC, y se incubaron en agitación a 37°C, 180rpm, por 1h. Posteriormente, cajas de agar LB/ampicilina 100µg/ml, se inocularon con 50, 100, 150 y 200µl de las células transformadas y recuperadas en medio SOC. Las cajas se incubaron a 37°C por 16h.

### 3.12. Escrutinio de células transformadas

Se eligieron 10 colonias de las células transformadas, se pasaron por duplicado a nuevas cajas de agar LB/ampicilina 100µg/ml y se incubaron a 37°C por 16h. Con cada colonia se inoculó por separado 10ml de caldo LB/ ampicilina 100µg/ml y se incubó a 37°C, 180rpm, por 24h, para generar células y así extraer el plásmido. La extracción de plásmido se hizo con el kit UltraClean 6minute Mini Plasmid Prep (MO BIO) siguiendo las especificaciones del proveedor. La diferenciación entre los plásmidos que contenían el gen *amiJ33* y los que no lo contenían se hizo por electroforesis con gel de agarosa 0.8% (p/v).

### 3.13. Escrutinio de clonas por patrón de restricción

El plásmido, así como el gen *amiJ33*, contienen un sitio *NcoI*, por lo que se utilizó la enzima *NcoI* (BioLabs) para seleccionar las clonas con el inserto en el sentido adecuado, la verificación se realizó con el programa *Restriction map* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/rest\\_map.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html)). Se usaron 25µl de plásmido (40ng/µl), 2.5µl de amortiguador NE310X, 9.5µl de agua libre de nucleasas y 1µl de enzima *NcoI* (10,000U/ml). La reacción se incubó a 37°C por 1h. Posteriormente se cargaron 25µl de la reacción en un gel de agarosa 0.8% (p/v).

Los plásmidos que liberaron los fragmentos esperados se eligieron y se secuenciaron por Macrogen Inc y por la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias resultantes se empalmaron en *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

### 3.14. Caracterización molecular de *amiJ33*

Se verificó que la secuencia empalmada de *amiJ33* no fuera quimérica mediante el programa *Bellerophon* (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>). El contenido de G+C de la secuencia se evaluó con el programa *Oligo calculator* (<http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html>).

Se evaluó el modelo para la construcción de filogenias con el programa *FindModel* (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). El modelo filogenético se construyó usando MEGA V6 (Tamura y col., 2013).

El pI (punto isoeléctrico) teórico de AmiJ33r se obtuvo con el programa *Protein Isoelectric Point* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/protein\\_iep.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html)). Así mismo, con la secuencia de AmiJ33r se realizó un multialinamiento con *ESPrpt* (<http://www.esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi?FRAME=MAIN>) y una comparación de estructura terciaria en *SWISS-MODEL* (<http://www.swissmodel.expasy.org/interactive>).

### **3.15. Técnicas enzimáticas y bioquímicas**

#### **3.15.1. Ensayo de actividad enzimática en caja**

Las células transformadas de *E. coli* que contenían los plásmidos recombinantes se inocularon por duplicado en cajas Petri con agar LB/ampicilina 100µg/ml/ almidón al 1% (p/v)/ 0.2% de L-arabinosa, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se realizó el revelado *in situ* de la actividad amilasa impregnando la caja con una solución de lugol (0.33% p/v de I y 0.66% p/v de KI). Las colonias expresaron el gen *amiJ33* y mostraron un halo transparente, indicando la hidrólisis del almidón. Como control positivo y negativo se usaron *B. amyloliquefaciens* JJC33M y *E. coli* TOP10 sin plásmido respectivamente, las cuales se inocularon en agar LB/ almidón al 1% (p/v) y se crecieron a 37°C durante toda la noche.

#### **3.15.2. Sobreexpresión de *amiJ33***

Se tomó un vial de las células transformadas de *E. coli*, almacenadas previamente en glicerol a -20°C, que contenían el plásmido seleccionado y se inoculó al 1% en 10ml de caldo LB/ampicilina 100µg/ml. El inóculo se incubó a 37°C, 180rpm durante 16h. Posteriormente, estas células se utilizaron para inocular al 10% (v/v) nuevos tubos con caldo LB/ampicilina 100µg/ml y se incubaron a 37°C, 180rpm, hasta alcanzar 0.5 unidades de DO<sub>600nm</sub>, momento en el cual se indujo la expresión de *amiJ33* agregando al cultivo una concentración final de 0.0002, 0.002, 0.02 y 0.2% de L-arabinosa e incubando por 4h más

a 37°C, 180rpm. Se colectó 1ml de cultivo antes y al final de la inducción, el pellet celular se resuspendió en 50µl de amortiguador de carga SDS-PAGE 2X, posteriormente la mezcla se calentó en baño maría a 100°C por 5min y fue analizado en SDS-PAGE 10%. Se observó la máxima expresión usando 0.2% de L-arabinosa.

### **3.15.3. Purificación de AmiJ33r**

#### ***3.15.3.1. Precipitación de AmiJ33r con sulfato de amonio***

El extracto crudo enzimático de *E. coli* se saturó al 60 y 80% con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de amonio) (J. T. Baker). Después de cada saturación, el extracto crudo enzimático se centrifugó a 10,000xg por 10min. Se obtuvieron dos precipitados (F60 y F80), procedentes de las dos saturaciones, los cuales se resuspendieron y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0, centrifugando a 5,500rpm por 15min (HERAEUS MEGAFUGE 16R Thermo SCIENTIFIC) con filtros de 10,000 MWCO (MILLIPORE). Utilizando los mismos filtros cada precipitado se concentró cincuenta veces el volumen inicial del extracto crudo enzimático. Se observó la mayor actividad en F80.

#### ***3.15.3.2. Purificación de AmiJ33r por cromatografía de afinidad***

AmiJ33r se purificó por medio de cromatografía de afinidad en condiciones nativas con una resina de Ni-NTA (QIAGEN®) y en *batch* siguiendo las siguientes condiciones: la resina (1ml) se equilibró con 2ml de amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM). Se agregaron 4ml de la mezcla extracto enzimático-amortiguador de lisis 2X en proporción 1:1, a la resina equilibrada. Esta mezcla se incubó a 4°C, 120rpm, por 1h. El producto se cargó en una jeringa de 5ml que se utilizó como soporte, previamente preparada con discos de papel filtro de 0.4µm en el fondo para retener la resina. De acuerdo con el proveedor se realizaron 5 lavados con 0.5 ml de amortiguador de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazol 20mM) para eliminar las proteínas contaminantes. AmiJ33r se eluyó con 4 volúmenes de 0.5ml de amortiguador de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazol 250mM). El pH de los amortiguadores de lisis, lavado y elución se ajustó a 8.0 con NaOH. El flujo, los lavados y las eluciones fueron analizados en SDS-PAGE 10%. La enzima purificada se dializó con membranas de diálisis en amortiguador de acetatos 50mM pH 5.0 durante toda la noche para eliminar el imidazol.

### **3.16. Electroforesis de proteínas**

Para analizar la sobreexpresión de AmiJ33r, el pellet celular obtenido en la sección 3.15.2 y la enzima purificada se resuspendieron en amortiguador de carga SDS-PAGE 2X en proporción 1:1 pellet/enzima: amortiguador y se calentaron en baño maría a 100°C por 5min. Posteriormente, se cargaron 15µl de cada muestra y las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE 10%. Se usó la cámara de electroforesis vertical para geles de 1mm de espesor (Mini-PROTEAN Tetra System BIO –RAD). El gel concentrador se preparó al 4% y el de separación al 10% (las proteínas que se logran separar bajo estas condiciones pesan entre 50 y 200kDa). La migración se efectuó a un amperaje constante de 25mA por gel. Se utilizó como amortiguador de corrida una solución de tris-base 15.1g/l, glicina 72g/l y SDS 5g/l y como amortiguador de carga una solución de tris 1M pH 6.8, glicerol 1ml, 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 20min 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).

### **3.17. Zimograma**

Se usó un gel de poliacrilamida 10% sin SDS (nativo) adicionado con almidón gelatinizado al 1% (v/v, concentración final). El almidón se gelatinizó en autoclave a 121°C por 15min. El SDS también se eliminó del amortiguador de carga y de corrida para evitar la inhibición de AmiJ33 (Montor y col., 2014) y AmiJ33r. La migración se efectuó a un amperaje constante de 25mA por gel. Al término de la electroforesis, los geles se lavaron brevemente (3 a 5min) con agua destilada y posteriormente se sumergieron en una solución 2.5% (v/v) de tritón x-100 (Sigma-Aldrich) en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0 e incubando a 4°C por 1h. Posteriormente, los geles se lavaron nuevamente con agua destilada y se sumergieron en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0, adicionado con CaCl<sub>2</sub> 1mM, incubando a 37°C por 2h. Los geles se revelaron sumergiéndolos en una solución de lugol (0.33% p/v de I y 0.66% p/v de KI). La actividad de la enzima se detectó por la presencia

de zonas claras en el gel. Se usó la luz blanca del transiluminador (Benchtop UV transilluminator, UVP) para evidenciar mejor las zonas claras.

### **3.18. Caracterización bioquímica de AmiJ33r**

#### **3.18.1. Determinación del efecto del pH y estabilidad de la actividad respecto al pH**

El efecto del pH sobre la actividad se evaluó midiendo la actividad de la enzima a distintos pHs: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, usando amortiguador de acetatos 50mM para pHs 4.0 y 5.0, y amortiguador de fosfatos 50mM para pHs 6.0, 7.0 y 8.0, amortiguador de Glicina-NaOH 50mM para pH 9.0. Para ello, se incubó 150µl de enzima a 37°C por 1h al pH de trabajo, posteriormente se agregó almidón gelatinizado al 1% (v/v, concentración final). En todos los casos el almidón se gelatinizó en autoclave a 121°C por 15min. La actividad se determinó por duplicado a 45°C, cuantificando azúcares reductores mediante la técnica del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Se definió una unidad (U) como un µmol de azúcar reductor, equivalente a glucosa, producido por minuto.

La estabilidad de la actividad respecto al pH se determinó a distintos pHs: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, y 9.0, usando amortiguador de acetatos 50mM para pHs 4.0 y 5.0, y amortiguador de fosfatos 50mM para pHs 6.0, 7.0 y 8.0, amortiguador de Glicina-NaOH 50mM para pH 9.0. La enzima se incubó a 4°C por 20h. Al término de la incubación, se agregó almidón gelatinizado al 1% (v/v, concentración final). La actividad residual de la enzima se determinó por duplicado para cada pH a 45°C, cuantificando azúcares reductores mediante la técnica del DNS.

#### **3.18.2. Determinación del efecto de la temperatura y estabilidad térmica de AmiJ33r**

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de AmiJ33r, se midió la actividad a 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C, en presencia de almidón gelatinizado al 1% (v/v, concentración final), al pH de mayor actividad. En todos los casos el almidón se preincubó durante 5min a temperatura ambiente, iniciando el ensayo de actividad al colocar la enzima.

La actividad enzimática se determinó cuantificando azúcares reductores mediante la técnica del DNS. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

La termoestabilidad de la enzima se determinó a 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C, midiendo su actividad residual a 45°C usando almidón gelatinizado al 1% (v/v, concentración final) al pH de mayor actividad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Con estos datos se determinó la vida media de la enzima ( $t_{1/2}$ ) y la constante de desactivación de primer orden  $k$ . A partir del cálculo de  $k$  se estima la vida media.

A partir de:  $\ln A = -kt + \ln A_0$ , se puede demostrar que:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -kt$$

Donde  $A_0$  es la actividad inicial y  $A$  es la actividad al tiempo “ $t$ ”, por lo tanto la vida media ( $t_{1/2}$ ) se calcula:

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

### **3.18.3. Efecto de agentes iónicos, quelantes y surfactantes sobre la actividad de AmiJ33r**

La influencia de agentes iónicos (1, 5 y 10mM) sobre la actividad de AmiJ33r se determinó usando  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{NaCl}$ . La molaridad de los iones se ajustó manteniendo la misma fuerza iónica para todos los iones. La fuerza iónica se define según la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{1}{2} ([A]Z_A^2 + [B]Z_B^2 + [C]Z_C^2 + \dots)$$

Donde  $\mu$ =fuerza iónica,  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$ = concentración de las especies iónicas,  $A$ ,  $B$ ,  $C$ = especie iónica,  $Z_A$ ,  $Z_B$ ,  $Z_C$ = carga de la especie iónica (Skoog y col., 2005).

Se evaluó el efecto de SDS (1% v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (1% v/v) y EDTA (1, 5 y 10 mM) preincubando la enzima a 37°C por 1 h, al pH de mayor actividad, posteriormente se

adicionó 1% (concentración final) de almidón gelatinizado. La actividad relativa se determinó a 45°C por medio de la técnica del DNS. El control fue cuantificado en ausencia de iones y de agentes quelantes. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Mediante MINITAB V14 se realizó un ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) de las medias de la actividad relativa y seleccionó la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para identificar la media significativamente más alta.

#### **3.18.4. Determinación de los parámetros cinéticos**

La determinación de la velocidad inicial se realizó a 45°C en un intervalo de 2 a 16mg/ml de almidón gelatinizado. Se usó la técnica del DNS para la cuantificación del poder reductor. Las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron determinadas mediante forma linearizada de la ecuación de Michaelis-Menten.

Ecuación de Michaelis-Menten:  $V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$

Linearizando:  $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$  Ecuación de Lineweaver-Burk:

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento del gen *amiJ33* de *B. amyloliquefaciens* JJC33M

El programa *primers4clades* generó un solo par de oligonucleótidos degenerados para cada grupo de secuencias, con 90 y 100% de calidad respectivamente y con una cobertura casi completa del gen blanco (fig. 8).

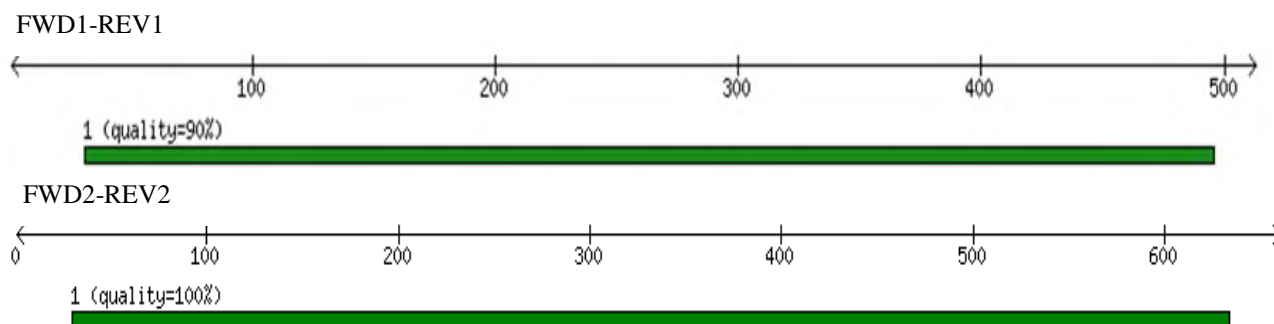


Figura 8. Representación gráfica de los oligonucleótidos degenerados.

Se redujo la longitud de los oligonucleótidos para disminuir la  $T_m$ . La  $T_m$  final se determinó mediante la ecuación de Wallace:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  (Wallace y col., 1979). De esta forma, las  $T_m$ s de FWD1, REV1 y FWD2 se redujeron a 58.6, 62.1 y 53.2°C respectivamente (tabla 5). La  $T_m$  de REV2 se mantuvo sin modificaciones. Sin embargo, mediante la ecuación de Wallace no se logró una buena aproximación a la  $T_m$  real de los oligonucleótidos (<http://www.ibt.unam.mx>), ya que al recibirlos físicamente estos presentaban una  $T_m$  elevada entre 68 y 71°C (tabla 5). Lo anterior indica que aunque el programa *primers4clades* presenta numerosas ventajas (Contreras y col., 2009) es necesario corroborar la  $T_m$  de los oligonucleótidos con otros programas.

#### 4.2. Amplificación de *amiJ33*

Usando los oligonucleótidos FWD2-REV2 y como templado el ADNg de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se obtuvo un producto de PCR de 1800pb aproximadamente. No se obtuvo producto de PCR usando los oligonucleótidos FWD1-REV1 o con las combinaciones de los oligonucleótidos.

El producto de PCR obtenido fue clonado en el plásmido pCR®-XL-TOPO® dando lugar al plásmido amy+XL. La secuencia clonada fue secuenciada y analizada, identificándose como la secuencia parcial de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor y del Moral, 2014), sin embargo, el fragmento de ADN clonado no se encontró en el marco de lectura correcto para su expresión, esto fue algo que no se advirtió al diseñar los oligonucleótidos degenerados, por lo que la siguiente estrategia consistió en rediseñar oligonucleótidos para clonar en marco de lectura en un plásmido inducible. Con el fin de determinar si el gen *amiJ33* se encontraba localizado en plásmidos o cromosomas, se realizó una purificación de ADNg y de plásmido por separado. Con esto se confirma que *B. amyloliquefaciens* JJC33M no posee ADN extracromosomal y por lo tanto *amiJ33* se encuentra en el ADNg. En el genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (Montor y col., 2015) se identificó una secuencia de 1980pb con identidad (99%) con un gen codificante para una  $\alpha$ -amilasa. De esta forma se obtuvo el gen completo *amiJ33*.

#### **4.3. Análisis molecular y secuencia aminoacídica de AmiJ33r**

La secuencia nucleotídica del gen *amiJ33* contiene un 46% de G+C, lo que es consistente con el valor observado de otras secuencias de la base de datos del NCBI. En el genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M se encontró la secuencia consenso de la región de unión a ribosoma (RBS) AGGAG 8 nucleótidos por arriba del codón de inicio (ATG) de *amiJ33*. Según lo predicho por el programa *Neural Network Promoter Prediction*, se identifica una región promotora putativa 174 nucleótidos arriba del codón de inicio con las secuencias -10 TATAGA y -35 TTGATA las cuales están 32 nucleótidos de distancia entre ellas. Se sabe que la fuerza de un promotor radica básicamente en las secuencias de las cajas -35 y -10 y en la distancia que las separa (Perera y col., 2002), por ejemplo, en varios promotores de *E. coli* las cajas -10 y -35 están separadas por 17 nucleótidos, es probable que la distancia que existe entre las cajas -35 y -10 del promotor de *amiJ33* sea el causante de la baja expresión de AmiJ33 y por lo que se requiere hacer ajustes en las condiciones de cultivo para lograr producir suficiente enzima (Montor y col., 2014). Por tal motivo se decidió clonar y expresar *amiJ33* en *E. coli*. La secuencia de la región promotora, el gen *amiJ33* y la proteína se presentan a continuación:

AGGCGTTCTGTTTTTGCTTCGGTATGTCATTGTGAAGCTGTCTTACAGAAGAGCGATAAA 60

AGAAGTGAAAAAGAAATCATC**TTGATA**GGTGGTTTCTTTTTTTGTTGATCTGATAGGAAT 120

**-35**

**ATAGA**TTTGATTTCACTCTGACACGTTGCTTTGATAGAGAGTGTGTGATAAGTTGAAATG 180

**-10**

AAAGCGTTAACAAAATTCTCCAGTCTTCACAACATTCGAAAGGGGGAAGCTGAAGAAAGG 240

GTAAGAGGAATTTTTGACTCCGCAGTCAGTCTTCAAAAATCAAATA**AGGAG**TGTCAAAA 300

**RBS**

**ATG**TTTGAAAAACGATTCAAACCTCTTTACTGCCGTTAGTCGCCGGATTTTTATTGCTG 360

M F E K R F K T S L L P L V A G F L L L

Péptido señal TTTCAATTTGGTTTTGTCAGGGCCTGCGGCTGCAAACGCTGAAACCGCTGACAAATCAAAT 420

F H L V L S G P A A A N A E T A D K S N Región-P

GAGGTGACCGCATCTTCAGTCAAAAGCGGAACCATCCTTCATGCCTGGAATTGGTCATTC 480

E V T A S S V K S G T I L H A W N W S F Inicio del dominio A

AATACGTTAACACAAAATATGAAAGATATTCGTGATGCAGGCTATGCAGCCATTCAGACG 540

N T L T Q N M K D I R D A G Y A A I Q T

TCTCCGATTAACCAAGTAAAGGAAGGGAACCAAGGAGATAAGAGCATGAGGAATTGGTAC 600

S P I N Q V K E G N Q G D K S M R N W Y

TGGCTGTATCAGCCGACATCGTACCAAATCGGCAACCGTTACTTAGGAACTGAACAAGAG 660

W L Y Q P T S Y Q I G N R Y L G T E Q E

TTTAAGGACATGTGCGCAGCCGCAGAAAATATGGCGTAAAAGTCATTGTGCGATGCGGTC 720

F K D M C A A A E K Y G V K V I V D A V

ATCAATCATAACGACCAGTGATTATAGCGCGATTTCTGACGAGATTAAGCGTATTCCAAAC 780

I N H T T S D Y S A I S D E I K R I P N

TGGACCCATGGAAACACACAAATTA AAAATTGGTTCGGACAGATGGGATGTCACTCAAAT 840

W T H G N T Q I K N W S D R W D V T Q N

TCACTATTGGGGCTGTATGATTGGAATACTCAAAAATACTGAGGTGCAAACCTATCTGAAA 900

S L L G L Y D W N T Q N T E V Q T Y L K

CGCTTCTTGGAAAGAGCATTGAATGACGGAGCGGACGGATTCCGTTATGATGCTGCCAAG 960  
R F L E R A L N D G A D G F R Y D A A K

CATATAGAGCTTCCGGATGACGGGAATTACGGCAGCCGATTTTGGCCGAATATCACAAAT 1020  
H I E L P D D G N Y G S R F W P N I T N

ACAGCGGCGGAATTCCAATACGGAGAAATCCTGCAAGACAGCGCGTCCAGAGATACTGCT 1080  
T A A E F Q Y G E I L Q D S A S R D T A

TATGCGAATTATATGAATGTGACCGCTTCAAACCTATGGACATTCCATCAGGTCCGCCTTG 1140  
Y A N Y M N V T A S N Y G H S I R S A L

AAGAACC GCAATCTGAGTGTGTGCGAATATTTCCATTATGCATCTGATGTGTCTGCGGAC 1200  
K N R N L S V S N I S H Y A S D V S A D

AAATTGGTCACATGGGTGGAATCACATGATACGTATGCCAATGATGAGGAAGAGTCTACA 1260  
K L V T W V E S H D T Y A N D E E E S T

TGGATGAGCGATGACGATATCCGTTTAGGCTGGGCAGTGATCGGTTCCCGCTCAGGAAGT 1320  
W M S D D D I R L G W A V I G S R S G S

ACACCTCTTTTCTTTTCCAGACCTGAGGGCGGAGGAAATGGTGTAAGATTTCCCGGAAAA 1380  
T P L F F S R P E G G G N G V R F P G K **Fin del dominio A**  
←

AGTCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCATTATTTAAAGATCAAGCGATCACTGCGGTCAAT 1440  
S Q I G D R G S A L F K D Q A I T A V N

ATCTTTCACAATGTAATGGGCGGTGAGCCTGAGGAACTCTCGAATCCGAATGGGAACAAT 1500  
I F H N V M G G Q P E E L S N P N G N N

CAAATCTTTATGAATCAGCGCGGCTCAAAGGCGTTGTGCTGGCAAATGCAGGATCGTCT 1560  
Q I F M N Q R G S K G V V L A N A G S S **Inicio del dominio C**  
→

GCCGTTGCCGTCAATACGTCAACGAAATTACCTGACGGCAGGTATGATAATAGAGCCGGC 1620  
A V A V N T S T K L P D G R Y D N R A G

ATCGGTTCAATTTCAAGTGACGAACGGTAAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGATCCGTT 1680  
I G S F Q V T N G K L T G T I N A R S V

GCTGTTCTTTATCCTGACGATATCGGAAATGCGCCTCATGTCTTCCTTGAGAATTATCAA 1740  
 A V L Y P D D I G N A P H V F L E N Y Q  
 ACGGGAGCAGTCCATTCTTTCAACGATCAGCTGACGGTCACCCTGCGTGCAAATGCGAAA 1800  
 T G A V H S F N D Q L T V T L R A N A K ← Inicio de la región extra  
 ACAACAAAAGCCGTTTATCAAATCAATAATGGGCAGCAGACGGGATTTAAGGACGGAGAC 1860  
 T T K A V Y Q I N N G Q Q T G F K D G D  
 CGATTAACGATCGGAAAAGGAGATCCAATCGGCACGGCATAACGACATCAAGTTAACCGGA 1920  
 R L T I G K G D P I G T A Y D I K L T G  
 ACGAACAGCGAGGGTGCAGCAAGAACCCAAGAATACACGTTTGTCAAAAAAGACCCGTCT 1980  
 T N S E G A A R T Q E Y T F V K K D P S  
 CAAGCCAACATCATTGGCTATCAGAATCCGGACCATTGGGGCCAGGTAAATGCTTATATC 2040  
 Q A N I I G Y Q N P D H W G Q V N A Y I  
 TATAAACATGATGGAGGCAGGGCCATAGAATTAACCGGATCGTGGCCGGGGAAAGCCATG 2100  
 Y K H D G G R A I E L T G S W P G K A M  
 ACTAAGAATGCAGATGGAATTTACACGCTGACACTGCCTGAGAATGCGGATACGGCCAAC 2160  
 T K N A D G I Y T L T L P E N A D T A N  
 GCCAAAGTGATTTTTAACAATGGCAGCGCCCAAGTGCCCGGACAGAACCAGCCCGGCTTT 2220  
 A K V I F N N G S A Q V P G Q N Q P G F  
 GATTATGTGAAGAATGGTTTGTATAACAATTCTGGTTTGAATGGCTATCTTCGGCATTAA 2280  
 D Y V K N G L Y N N S G L N G Y L R H ← Fin de la región extra

La secuencia de *amiJ33* traducida consiste en una secuencia de 659 aminoácidos con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 6.52, y un peso molecular calculado de 72kDa. El análisis de la secuencia aminoacídica revela que AmiJ33r tiene una alta identidad con  $\alpha$ -amilasas de del género *Bacillus* y que la estructura primaria está compuesta por un péptido señal, una región-P, un dominio A (317aa), un dominio C (76aa) y una región extra (176aa) (fig. 9).

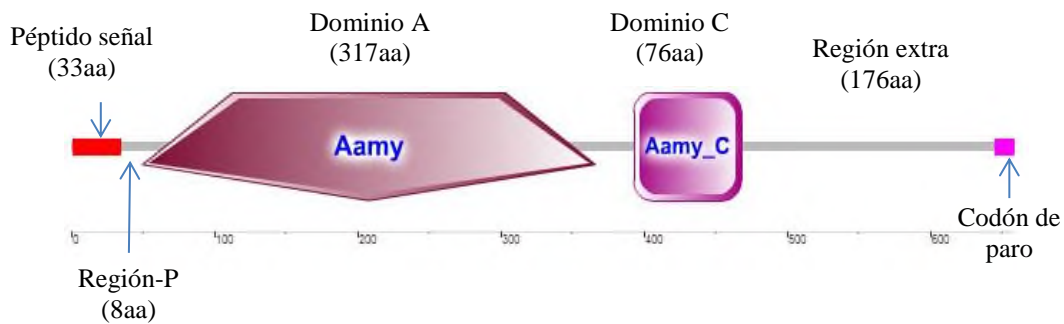


Figura 9. Representación gráfica de AmiJ33r.

### 4.3.1. El péptido señal

El péptido señal de AmiJ33r está compuesto por 33 aminoácidos con la siguiente secuencia: MFEKRFKTSLLPLVAGFLLLFHLLVLSGPAAANA. Es muy similar a los péptidos señal de otras enzimas hidrolíticas, por ejemplo BKA (Salimi y col., 2012) y AmyQ (Yang y col., 2012) ( $\alpha$ -amilasas), BsubMan (manasa), y Blichen13/8785Chi (quitinasa). Los péptidos señal de estas enzimas, incluyendo el de AmiJ33r, contienen las regiones N (positiva), H (hidrofóbica) y C (polar) (fig. 10) las cuales son reconocidas por la maquinaria celular para guiar a las enzimas al exterior de la célula (Kakeshita y col., 2012). Estas regiones también se pueden identificar en el péptido señal de la proteína de membrana externa OmpA de *E. coli* (Yamabhai y col., 2008). Se ha reportado que las enzimas recombinantes producidas en *E. coli* que tienen un péptido señal similar al de OmpA luego de ser transportadas al espacio periplasmático son secretadas al medio celular (Yamabhai y col., 2008).

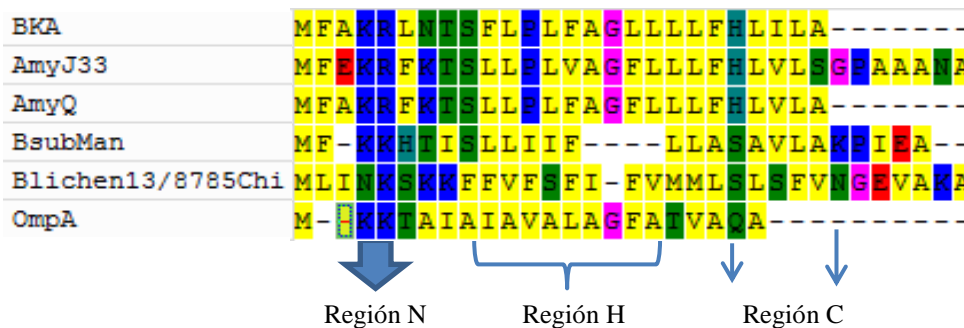


Figura 10. Multialineamiento del péptido señal de AmiJ33r.

Entre los aminoácidos 34 y 49 se ubica la región-P que consta de 8 aminoácidos de longitud con secuencia: ETADKSNEVTASSVKS, la cual indica el inicio de la proteína madura.

#### 4.3.2. Dominio A

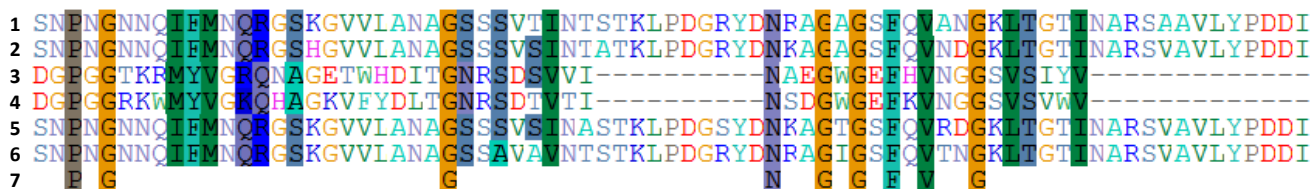
El análisis de la secuencia aminoacídica del dominio A (del aminoácido 50 al aminoácido 366) de AmiJ33r mostró que es 72 aminoácidos más pequeño que el de las  $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio (48-58kDa). Por varias razones es difícil saber si el dominio A contiene un dominio B. Por ejemplo, la longitud del dominio B varía sustancialmente (Jespersen y col., 1993), así como la posición y estructura secundaria. Dependiendo de la variación es o no considerado como un dominio independiente (Katsuya y col., 1998), por lo que se requieren de otros tipos de análisis del dominio A como multialineamientos o *threadings* para corroborar la presencia del dominio B.

Por otro lado, mediante un *BLAST* de la secuencia del dominio A se encontró identidad con  $\alpha$ -amilasas de bacterias del género *Bacillus* como *B. subtilis* AIU39224.1, *B. amyloliquefaciens* WP\_015388729.1 y *B. cereus* ADH93707.1 (99%) con los que AmiJ33r comparte una cercana relación filogenética, así como con *B. methylotrophicus* WP\_025650188.1 (97%), *B. tequilencis* WP\_024715525.1 (94%) y *B. vallismortis* WP\_010331366.1 (93%) que no son tan cercanas filogenéticamente a AmiJ33r. También se observó identidad con  $\alpha$ -amilasas de bacterias de otros géneros como *Sporosarcina pasteurii* WP\_029727055.1 (93%) y *Streptococcus pneumoniae* COO29881.1 (92%).

#### 4.3.3. Dominio C

El análisis de la secuencia aminoacídica del dominio C de AmiJ33, reveló que es 20 aminoácidos más grande que el de las  $\alpha$ -amilasas de peso molecular promedio. Además tiene un 100% de identidad con varias secuencias de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. A lo largo del dominio C de AmiJ33r se localizaron los aminoácidos que conforman el SBD (fig. 11), los cuales se encuentran muy conservados entre las  $\alpha$ -amilasas de diferentes especies y que tienen como función interaccionar con el almidón por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas por medio de aminoácidos aromáticos (principalmente tirosinas y triptófanos). En el caso de AmiJ33r, se puede observar en el

multialineamiento que hay pocos aminoácidos aromáticos relacionados con la interacción con el almidón (tirosinas T y triptófanos W), por lo que las interacciones que tienen los aminoácidos del SBD de AmiJ33r con el almidón nativo son en su mayoría puentes de hidrógeno.



**Figura 11.** Multialineamiento del SBD de AmiJ33r.

1: SBD de  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* sub. *plantarum* YAUB9601-Y2; 2: SBD de  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis* KC113313.1; 3: SBD de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* AF438149.1; 4: SBD de  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* E01180.1; 5: SBD de  $\alpha$ -amilasa de *B. sp.* KR-8104 EU717848.3; 6: SBD de AmiJ33r (*B. amyloliquefaciens* JJC33M); 7: Secuencia consenso.

#### 4.3.4. Región extra

El análisis de la secuencia aminoacídica de la región extra mostró identidad con las  $\alpha$ -amilasas de *B. amyloliquefaciens* WP\_043021495.1 (96%), *Salinibacillus aidingensis* WP\_044162004.1 (82%), *B. atrophaeus* WP\_010788973.1 (76%), *B. mojavensis* WP\_024120140.1 (74%), *Streptococcus gallolyticus* WP\_039694478.1 (42%) y *Streptococcus equinus* WP\_024343707.1 (40%). La región extra en las  $\alpha$ -amilasas está relacionada principalmente con la secreción de la enzima y normalmente se elimina durante las modificaciones postraduccionales (Salimi y col., 2012).

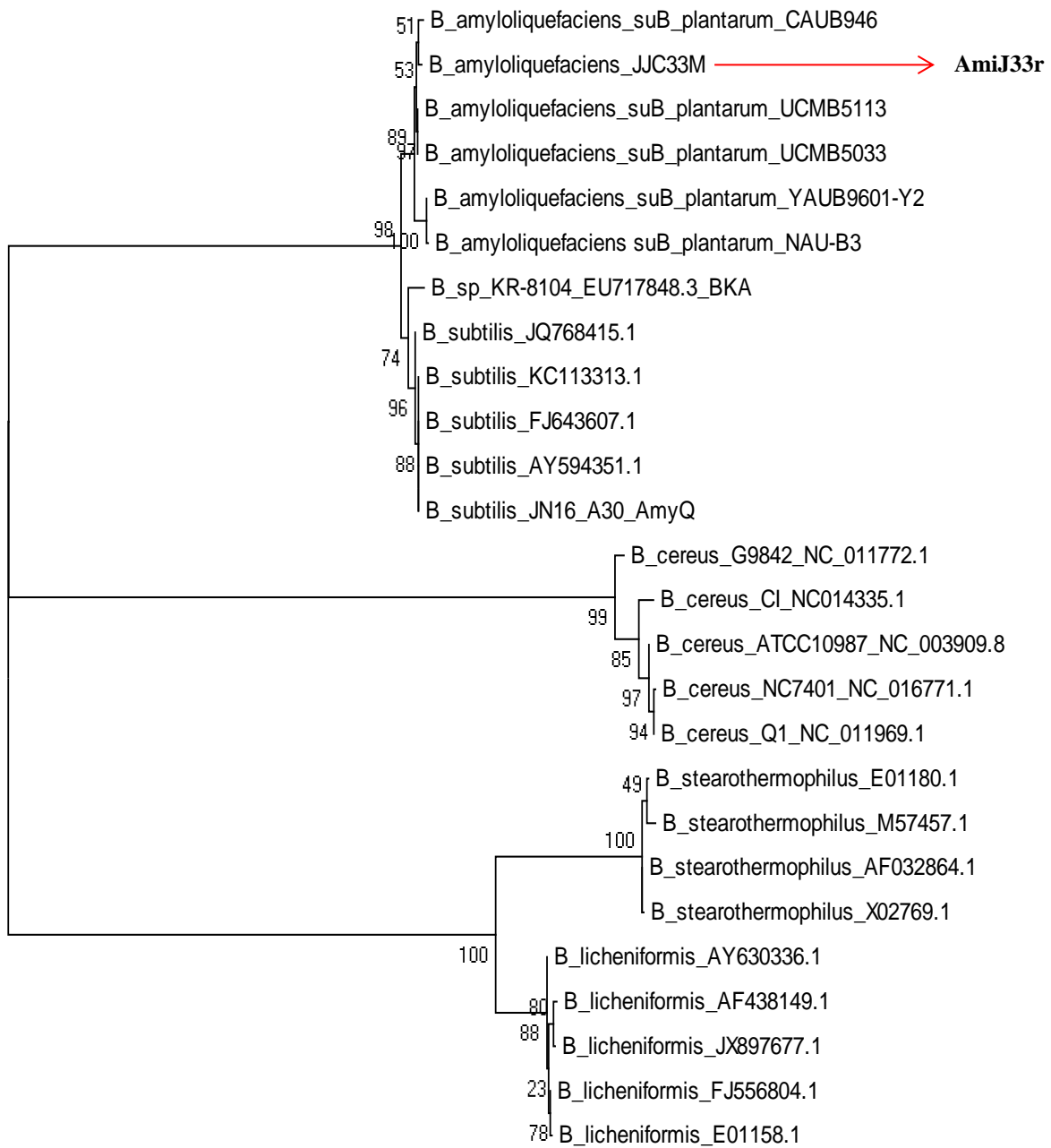
El análisis del tipo de aminoácidos presentes en la región extra (tabla 9) muestra que está compuesta por una gran cantidad de aminoácidos de tipo hidrofílico (<http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/cadena-lateral-en-aminoacidos>), con un total de 48.86% divididos en aminoácidos ácidos (25%), hidroxiaminoácidos (12.5%) y aminoácidos básicos (11.36%).

**Tabla 9.** Tipos de aminoácidos presentes en la región extra.

<b>Aminoácido</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
A (Alanina)	17	9.66
C (Cisteína)	0	0.00
D (Ácido aspártico)	11	6.25
E (Ácido glutámico)	5	2.84
F (Fenilalanina)	6	3.41
G (Glicina)	20	11.36
H (Histidina)	4	2.27
I (Isoleucina)	10	5.68
K (Lisina)	12	6.82
L (Leucina)	8	4.55
M (Metionina)	1	0.57
N (Asparagina)	16	9.09
P (Prolina)	8	4.55
Q (Glutamina)	12	6.82
R (Arginina)	4	2.27
S (Serina)	5	2.84
T (Treonina)	17	9.66
V (Valina)	9	5.11
W (Tryptofano)	2	1.14
Y (Tirosina)	9	5.11
Alifáticos (neutros) G,A,V,L,I	64	36.36
Aromáticos F,W,Y	17	9.66
Aminoácidos con azufre C,M	1	0.57
Básicos K,R,H	20	11.36
Ácidos B,D,E,N,Q,Z	44	25.00
Hidroxiaminoácidos S,T	22	12.50

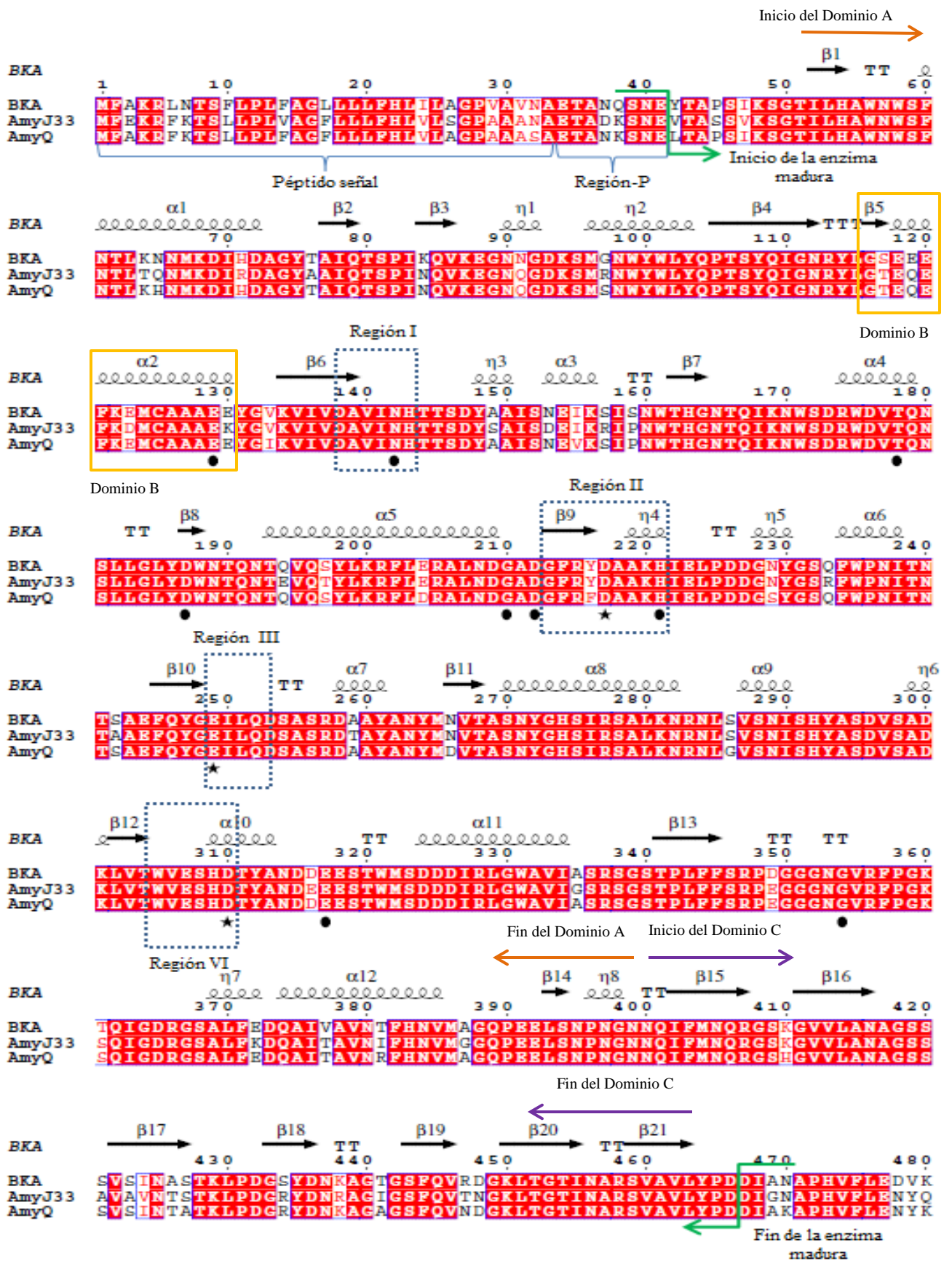
Algunos reportes han mostrado que la presencia de la región extra no tiene efecto significativo ni en la temperatura óptima ni en la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa BKA (Salimi y col., 2012).

Se construyó un modelo filogenético de la secuencia madura de AmiJ33r debido a que existe un bajo número de secuencias reportadas que incluyen el péptido señal y la región extra del C-terminal. Se usó el modelo JTT, con 1500 réplicas de *bootstrap*, el cual confirmó que AmiJ33r está íntimamente relacionada con las secuencias de  $\alpha$ -amilasas de *B. amyloliquefaciens* sp., *plantarum* (fig. 12).



**Figura 12.** Árbol filogenético de AmiJ33r.

Las diferencias y similitudes entre la secuencia de aminoácidos de AmiJ33r y otras secuencias de  $\alpha$ -amilasas previamente reportadas (BKA y AmyQ) se pueden observar a lo largo de la secuencia (fig. 13).



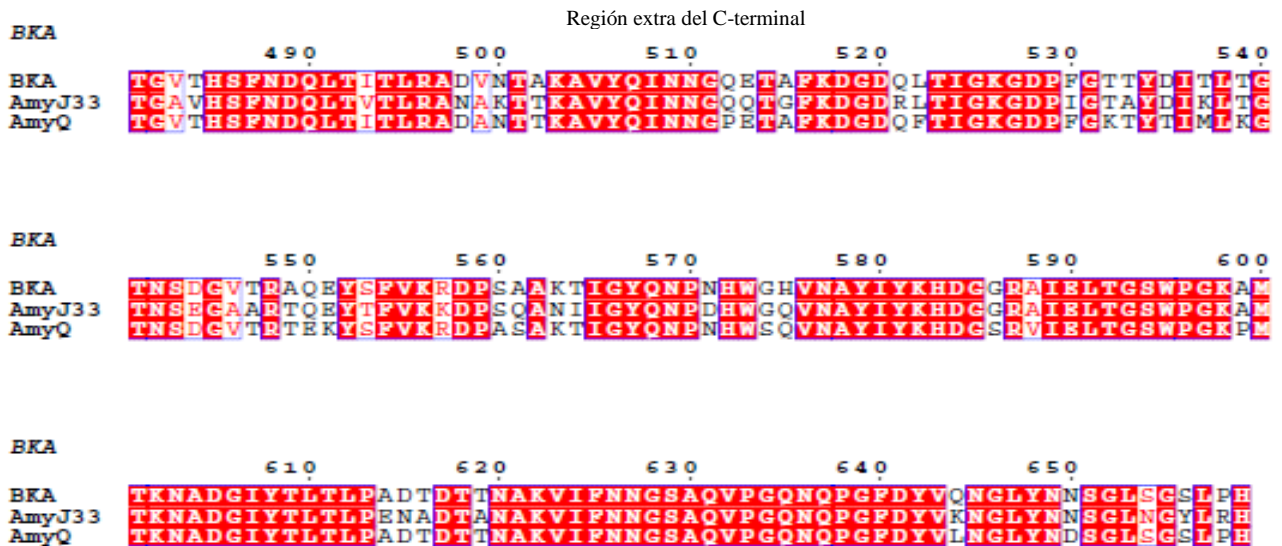


Figura 13. Multialineamiento de AmiJ33r.

$\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ), hojas  $\beta$  ( $\beta$ ), hélice  $3_{10}$  ( $\eta$ ), giro (T), residuos catalíticos (★) residuos de unión a metales (●).

Con base en el multialineamiento realizado con BKA y AmyQ se identificó que en AmiJ33r están presentes las cuatro regiones altamente conservadas en la familia de  $\alpha$ -amilasas. Sin embargo, a diferencia de proteínas como AmyK38 (Nielsen y col., 2000) estas regiones se encuentran desplazadas debido a que AmiJ33r aparentemente tiene 5 hojas  $\beta$  más. Los residuos catalíticos (Asp217, Glu249, Asp310), así como los residuos involucrados en la unión de metales (Glu129, Asn142, Thr178, Asp186, Gly210, Asp212, His221, Glu317, Gly354), se encuentran muy conservados. Sin embargo, AmiJ33r presenta una menor cantidad de residuos relacionados con la unión de metales comparada con secuencias de  $\alpha$ -amilasas más termoestables (Sajedi y col., 2006), lo que puede responder a por qué AmiJ33 solo conservó por 1h el 62% de la actividad a 60°C aún en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Montor y col., 2014).

La comparación de la secuencia aminoacídica de AmiJ33r arrojó que tiene 91.21% (mejor resultado) de identidad con el modelo 3D de BKA (PDB 3DC0) (Salimi y col., 2012). Con el análisis del modelo 3D se confirmó la presencia del dominio B que no fue posible discernir con el análisis hecho en la sección 4.3. El dominio B de AmiJ33r es más pequeño que el de otras  $\alpha$ -amilasas como AmyK38, lo que da respuesta a por qué el dominio A

contiene solo 317 aminoácidos. Además el dominio B se encuentra formado por  $\alpha$  hélices y no por hojas  $\beta$ , lo que lo hace menos visible (fig. 14).

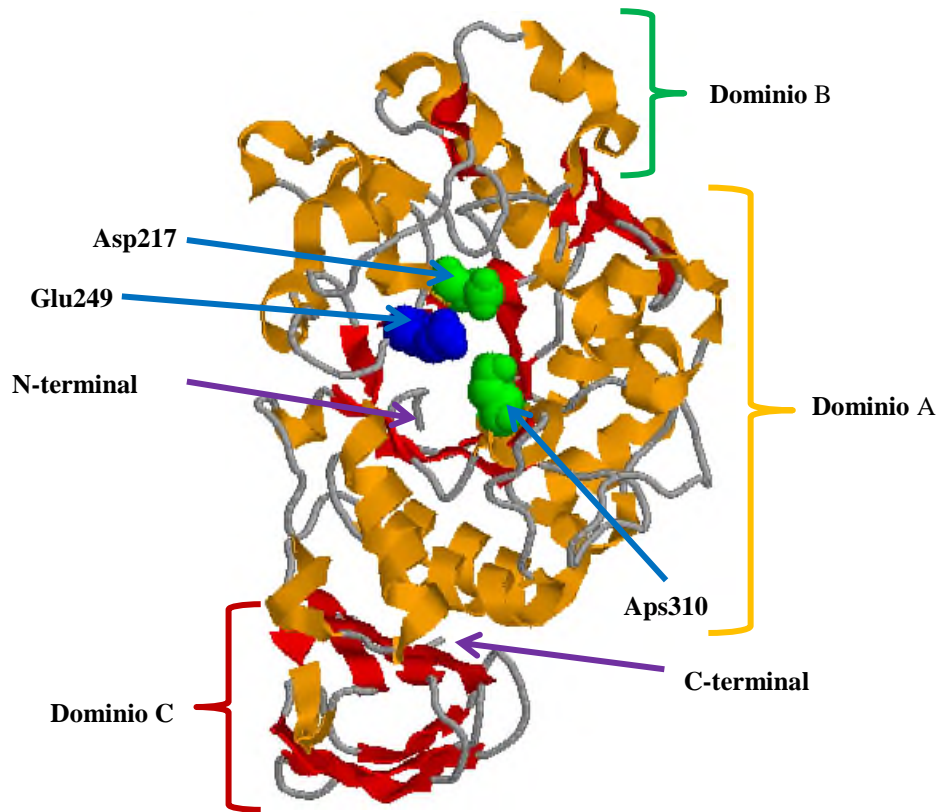


Figura 14. Estructura 3D homóloga de AmiJ33r.

#### 4.4. Expresión de *amiJ33* en *E. coli*

*AmiJ33* se amplificó con los oligonucleótidos FpBT-RpBT y el producto de PCR purificado se clonó en el plásmido pBAD-TOPO. Se siguieron las indicaciones del protocolo para la expresión de AmiJ33r, analizando la sobreexpresión por medio de electroforesis en geles de SDS-PAGE 10%, sin embargo no se observó sobreexpresión en ninguna de las concentraciones de arabinosa utilizadas, por lo que se decidió analizar la actividad  $\alpha$ -amilasa en caja.

Se observó actividad en caja de las colonias transformadas 1 y 9 después de 24h de incubación a 37°C en presencia de 0.2% de L-arabinosa (fig. 15). Este resultado sugirió que

AmiJ33r se exporta a través de la membrana celular de *E. coli*. Se ha reportado que las proteínas que contienen el péptido señal nativo similar al péptido señal OmpA (proteína de membrana externa) de *E. coli*, pueden ser secretadas eficientemente, mostrando actividad en presencia de los sustratos adecuados (Yamabhai y col., 2008).

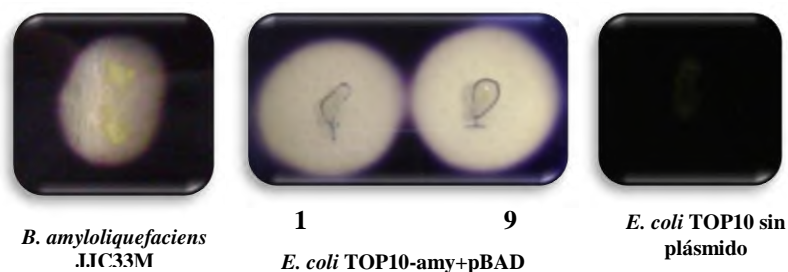


Figura 15. Prueba de actividad  $\alpha$ -amilasa en caja.

Se preparó un cultivo de la colonia transformada 1 (fig. 15) de *E. coli* TOP10, induciendo el gen *amiJ33r* con 0.2% de L-arabinosa.

#### 4.5. Purificación de AmiJ33r

AmiJ33r fue precipitada del medio libre de células (extracto crudo) con 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Posteriormente, AmiJ33r se purificó por afinidad con una resina de Ni-NTA, las eluciones que presentaron la mayor actividad se mezclaron. La enzima purificada presentó una actividad específica de 280U/mg, con un factor de purificación de 84.8 y un rendimiento de 56% (tabla 10).

Tabla 10. Purificación de AmiJ33r.

Etapa de purificación	Vol. <sup>1</sup> (ml)	Act. <sup>2</sup> (U/ml)	Proteína total (mg/ml)	Act. <sup>3</sup> total (U)	Act. <sup>4</sup> Esp. (U/mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1000	0.1	0.03	100	3.3	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	4.7	1.26	94	3.7	1.1	94
Ni-NTA	10	5.6	0.02	56	280	84.8	56

<sup>1</sup>Volumen; <sup>2</sup>Actividad; <sup>3</sup>Actividad total; <sup>4</sup>Actividad específica

Durante el proceso de precipitación se observó que en comparación con la cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  necesaria para precipitar AmiJ33 (60%), se requirió una mayor cantidad para

precipitar AmiJ33r (80%), lo cual sugiere que esta última es más hidrofílica. Este resultado es similar al reportado para purificar AmyQ A (Yang y col., 2012) y Amy28 (Teztrakoglu y col., 2013), que también fueron clonadas desde el péptido señal hasta el codón de paro. Así mismo, el análisis de la estructura primaria indica que el porcentaje de aminoácidos hidrofílicos es mayor en la recombinante que en la nativa, por tal motivo se incrementó el porcentaje de saturación para precipitarla con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

El peso molecular calculado a partir de la secuencia aminoácida de AmiJ33r es de 72kDa. Los componentes del sitio de unión múltiple del plásmido utilizado (pBAD-TOPO) para la clonación y expresión de AmiJ33r incrementan el peso molecular de la proteína recombinante en 5kDa, por lo tanto, el peso molecular esperado de AmiJ33r es de 77 kDa. Sin embargo, la enzima purificada mostró un peso molecular aproximado de 72kDa (fig. 16). En otros casos se ha observado que  $\alpha$ -amilasas recombinantes con las mismas características moleculares que AmiJ33r sufren modificaciones, por ejemplo AmyQ A (Yang y col., 2012) presentó un peso final de 57kDa, cuando *in silico* es de 72kDa, sin embargo se desconoce las partes perdidas de su estructura porque no se reporta un análisis detallado de la secuencia aminoácida.

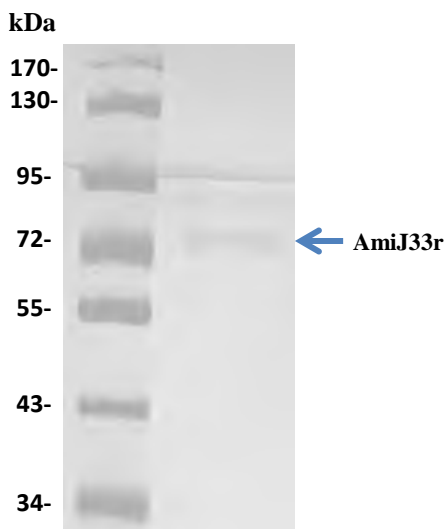


Figura 16. SDS PAGE de AmiJ33r purificada.

Se sabe que algunas cepas de *E. coli* producen menos proteasas que otras (Perera y col., 2002), lo cual es una variable importante a considerar si se desea mantener la integridad del producto. En este contexto se reportó que *E. coli* JM109 es capaz de mantener íntegra a Amy28 (Teztrakoglu y col., 2013).

Por otro lado, debido a que el SDS (10%) inhibe la actividad de AmiJ33 (Montor y col., 2014), este se eliminó del zimograma. Tanto AmiJ33r como AmiJ33 mostraron actividad en el gel concentrador (fig. 17). Se han obtenido resultados similares con otras  $\alpha$ -amilasas (Kubrak y col., 2010).

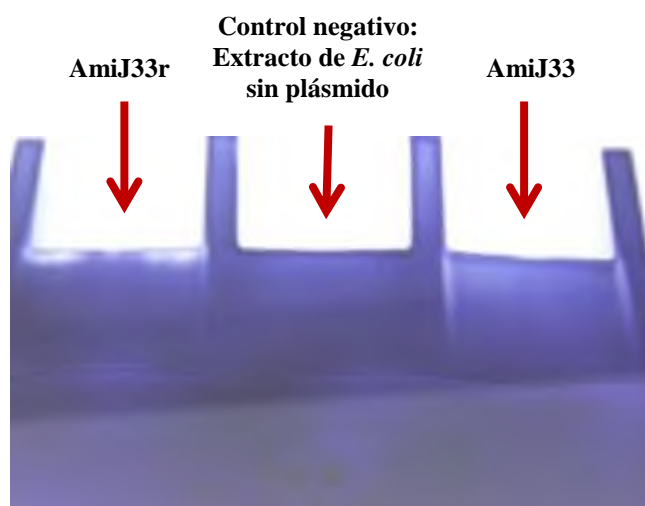


Figura 17. Zimograma en condiciones nativas de AmiJ33r y AmiJ33.

#### 4.6. Caracterización bioquímica de AmiJ33r

Al iniciar los experimentos de caracterización bioquímica se observó que AmiJ33r no era capaz de hidrolizar almidón nativo, sólo almidón gelatinizado, a diferencia de AmiJ33 que fue capaz de hidrolizar ambos (Hernández, 2015). Es posible que AmiJ33r no se esté fijando al almidón nativo, lo que lleva a suponer que el SBD de AmiJ33r está comprometido de alguna manera. Dado que el SBD se ubica en el dominio C-terminal (de acuerdo con los multilineamientos realizados) y con base en el análisis del tipo de aminoácidos presentes en la región extra del C-terminal, es posible que esta región esté

interfiriendo con la fijación del SBD de AmiJ33r al almidón nativo, al preferir formar interacciones electroestáticas con el agua. Esta es otra diferencia importante entre AmiJ33r y AmiJ33. Por lo tanto, todos los experimentos relacionados con la caracterización bioquímica y enzimática se realizaron con almidón gelatinizado.

#### 4.6.1. Efecto del pH en la actividad de AmiJ33r

AmiJ33r presentó un pH óptimo a 9, a diferencia de AmiJ33 que presentó un pH óptimo a 5 (Hernández, 2015). Así mismo, AmiJ33r parece ser más alcalófila porque la actividad de AmiJ33 cae a pH 8 y 9. En contraste, AmiJ33 muestra ser más estable a pHs ligeramente ácidos, ya que conserva el 75% de la actividad a pH 4 (Hernández, 2015), mientras que al mismo pH AmiJ33r solo conserva el 30% de la actividad. Como resultado se observan perfiles de actividad distintos (fig. 18).

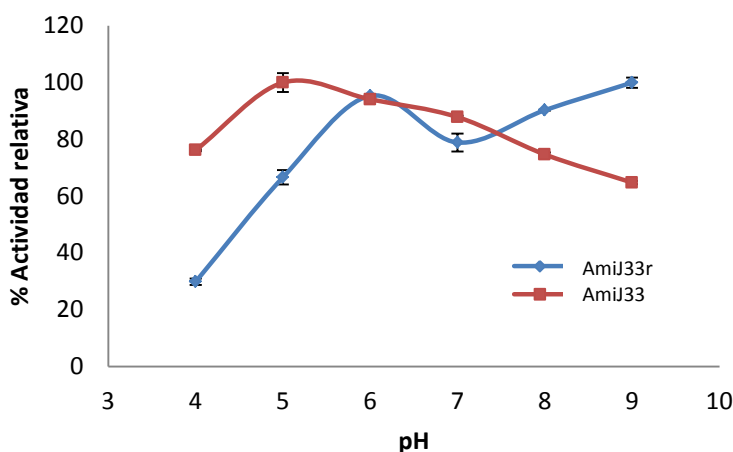


Figura 18. Efecto de pH en la actividad de AmiJ33 y AmiJ33r.

La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas que se conocen presentan mayor actividad a valores de pH neutro o ligeramente ácidos, como es el caso de AmiJ33 (Montor y col., 2014; Hernández, 2015). Otro ejemplo es AmyQ A que tiene un pH óptimo de 7 y su recombinante AmyQ B, presenta un pH óptimo de 5 (Yang y col., 2012). También se sabe que la actividad de la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas nativas disminuye rápidamente a valores de pH alcalinos (Goyal y col., 2005), lo que parece aplicar para algunas enzimas recombinantes (Yang y col., 2012), pero no para AmiJ33r. Aunque la máxima actividad de AmiJ33r se observó a pH 9,

no fue posible analizar pH más elevados debido a dificultades metodológicas como la hidrólisis del almidón y otras reacciones secundarias.

Salimi y col., en 2012 evaluaron entre otras cosas, el efecto del pH de la  $\alpha$ -amilasa madura recombinante (48kDa) y la versión que incluía la región extra del C-terminal (66kDa), reportando que no existían diferencias significativas al evaluar este parámetro. Sin embargo, en contraste con lo reportado por Salimi y col., 2012, la región C-terminal presente en AmiJ33r sí tiene efecto, ya que ésta es más alcalófila comparada con la nativa.

#### 4.6.2. Efecto del pH en la estabilidad de AmiJ33r

En cuanto al efecto del pH en la estabilidad, AmiJ33r se mostró estable a pH 5 (100%) y 7 (91%), a pH 4 solo mantuvo el 13% de actividad, en cambio a pH 8 mostró el 70% de actividad. AmiJ33 únicamente mantuvo su estabilidad a pH 5 (100%), a pH 4 mostró el 53% de actividad y a pH 8 mantuvo el 48% de la actividad (Hernández, 2015). El perfil de efecto del pH en la estabilidad de ambas enzimas es diferente (fig. 19).

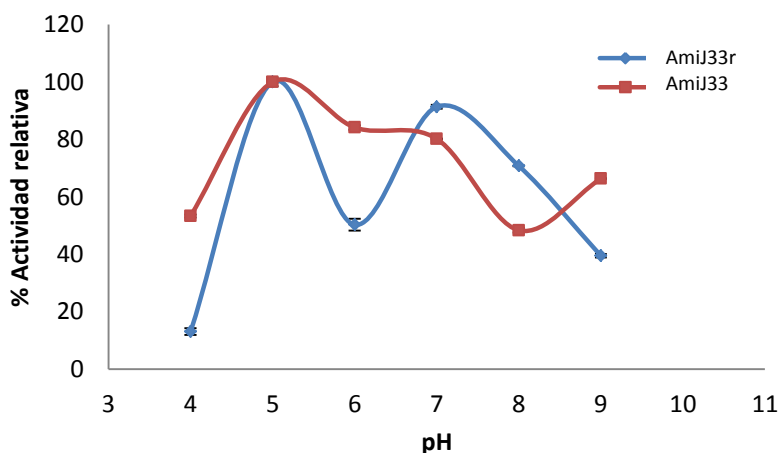


Figura 19. Estabilidad de la actividad de AmiJ33r y AmiJ33 respecto al pH.

Los resultados de efecto del pH en la actividad y en la estabilidad indican que AmiJ33r es más alcalófila que AmiJ33. Algunos autores señalan que es posible que las proteínas recombinantes cambien su conformación estructural cuando son expresadas y secretadas en *E. coli* (Yang y col., 2012). También es posible que debido a las regiones que no fueron procesadas (péptido señal y región extra en el C-terminal), el ambiente electrostático del

sitio activo pudo haber sido alterado (especialmente Glu249) (Abe y col., 2005). Sin embargo, es posible también que la existencia de las regiones adicionales en AmiJ33r, sobre todo la región extra del C-terminal, sirvan como amortiguadores de pH, proporcionando estabilidad a pHs alcalinos. Este comportamiento también fue observado en AmyQ B que es más estable a pHs alcalinos (pH 8.5), mientras que la enzima nativa, AmyQ A, mostró ser más estable a pHs ligeramente ácidos (pH 4.5) (Yang y col., 2012).

#### 4.6.3. Efecto de la temperatura en la actividad y termoestabilidad de AmiJ33r

El efecto de la temperatura se evaluó de 40 a 90°C (fig. 20) para AmiJ33r y la nativa (Hernández, 2015), ambas enzimas mostraron un perfil parecido. Se observó un incremento de actividad desde los 40°C hasta los 80°C, temperatura a la cual se registró la mayor actividad de ambas enzimas. A 70°C AmiJ33r mostró 85% de actividad residual, mientras que la nativa solo 73%. Posteriormente, la actividad disminuyó drásticamente mientras la temperatura aumentaba, sugiriendo que a 90°C las enzimas habían perdido su estructura terciaria. Los resultados sugieren que la existencia de la región extra en el C-terminal de AmiJ33r no tiene efecto significativo en la temperatura óptima, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores en los que se ha evaluado la importancia de la región extra del C-terminal (Salimi y col., 2012).

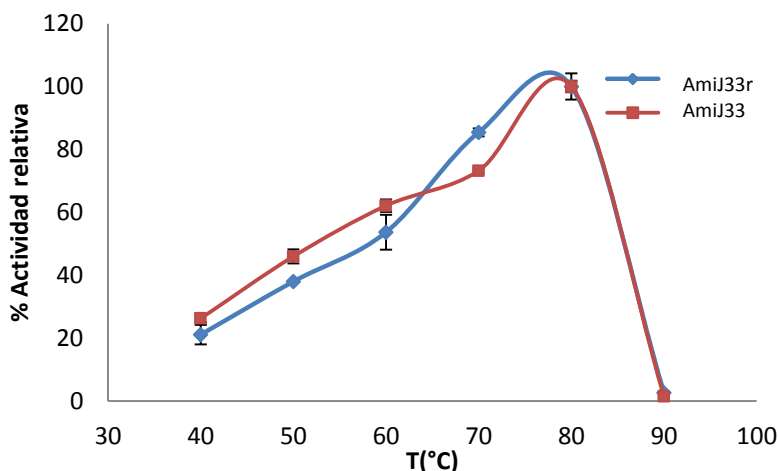


Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad de AmiJ33 y AmiJ33r.

Los resultados de efecto de la temperatura, tanto de AmiJ33 como de AmiJ33r, concuerdan con los obtenidos para otras  $\alpha$ -amilasas producidas por el género *Bacillus*, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* CUMC305 (Vaseekaran y col., 2010) presenta su mayor actividad entre 80 y 90°C, mientras que las  $\alpha$ -amilasas de *B. sp.* BBM1 (Quintero y col., 2009), *B. sp.* AB68 (Aygan y col., 2008), *B. cereus* MK8, *B. subtilis* MA9 (Devi y col., 2010) y *Bacillus sp.* BKL20 (Kubrak y col., 2010) presentan su máxima actividad entre los 50 y 80°C.

En cuanto a la termoestabilidad, AmiJ33r fue estable por 1h a 40°C (duración del experimento) presentando una vida media de 23h, y por 40 min a 50°C, reduciendo su vida media a 4.4 h. A 60°C la actividad disminuyó drásticamente, manteniendo solo el 35% de actividad por 30min, lo cual también se vio reflejado en la disminución drástica de la vida media a 0.3h. AmiJ33 mostró un perfil similar de termoestabilidad al de AmiJ33r (datos no mostrados) (Hernández, 2015). Metodológicamente no fue posible evaluar la termoestabilidad de AmiJ33r ni la de AmiJ33 a 70, 80 y 90°C.

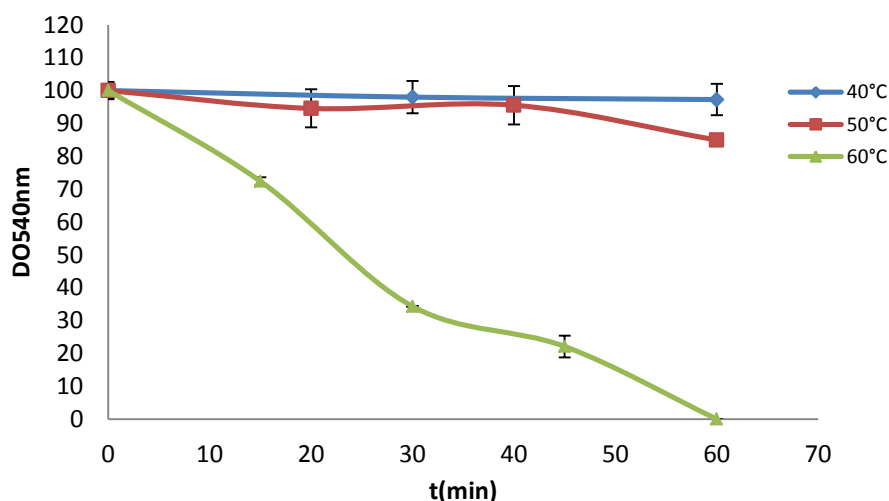


Figura 21. Termoestabilidad de AmiJ33r.

Al igual que los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura, no se observaron diferencias significativas entre AmiJ33r y AmiJ33 al evaluar la termoestabilidad, por lo que se sugiere que la región C-terminal no tiene efecto en la

termoestabilidad de AmiJ33r, como se ha demostrado para otras  $\alpha$ -amilasas (Salimi y col., 2012).

#### 4.6.4. Efecto de iones en la actividad de AmiJ33r

Se evaluó el efecto de iones monovalentes, divalentes y compuestos más complejos con actividad reductora o quelante sobre la actividad de AmiJ33r. La concentración de los iones se ajustó de acuerdo a la fuerza iónica con la finalidad de observar solo el efecto de los iones (Skoog y col., 2005). Los resultados se evaluaron mediante una prueba de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). De los agentes iónicos probados, el  $\text{Ca}^{+2}$  10mM y el  $\text{Mn}^{2+}$  5mM presentaron la medias significativas más altas de actividad incrementándola 15 y 22%, respectivamente (fig. 22).

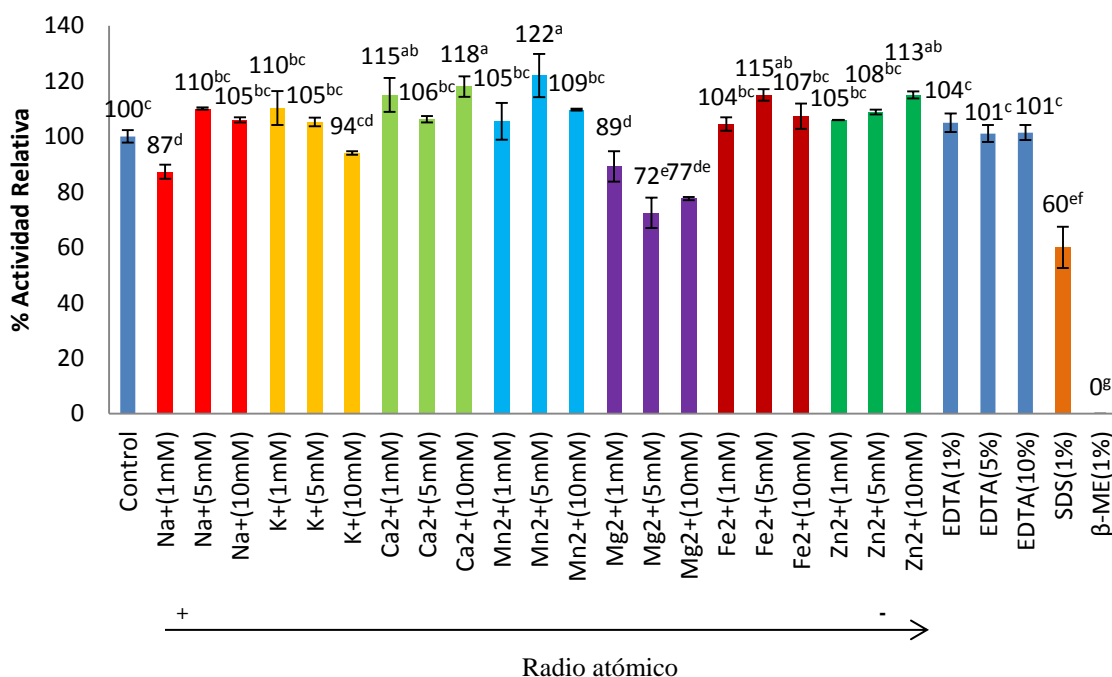


Figura 22. Efecto de agentes iónicos, quelantes y desnaturalizantes sobre la actividad de AmiJ33r.

Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencia significativa.

El  $\text{Mg}^{2+}$  fue el único agente iónico que tuvo un efecto negativo en la actividad de AmiJ33r y AmiJ33 (Hernández, 2015) (datos no mostrados), lo cual ya se ha reportado para otras  $\alpha$ -amilasas, por ejemplo para las producidas por *Bacillus* sp. I-3 (Shodi y col., 2005; Goyal y

col., 2005) y *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 (Gangadharan y col., 2009). Las razones por las cuales algunos agentes iónicos inhiben la actividad de algunas  $\alpha$ -amilasas se deben a la competencia entre iones exógenos y los que se encuentran asociados a la enzima en los sitios de unión a iones, o bien, a un efecto inhibitorio directo de dichos iones por interacciones con residuos aminoacídicos que contribuyen a la actividad o la unión al sustrato, resultando en cambios conformacionales (Chai y col., 2012).

Está ampliamente reportado que el  $Zn^{2+}$  tiene efecto inhibitorio en las  $\alpha$ -amilasas termoestables (Arikan, 2008; Dheeran y col., 2010). Sin embargo, la actividad de AmiJ33r se incrementó gradualmente al aumentar la concentración de  $Zn^{2+}$ , observándose un aumento del 13% de la actividad a una concentración de 10mM del ión. Lo anterior puede indicar la naturaleza mesófila de AmiJ33r como sugieren algunos autores (Mamo y Gessesse, 1999).

Dado que sólo con  $Ca^{+2}$  y el  $Mn^2$  se observaron los mayores efectos en la actividad enzimática, es posible que este efecto se deba a sus radios atómicos, ya que con otros iones de mayor o menor radio atómico no se incrementó la actividad significativamente.

AmiJ33 no es una metaloenzima (Montor y col., 2014). Lo anterior se confirmó nuevamente al evaluar el efecto del EDTA (1, 5 y 10mM) sobre la actividad de AmiJ33r, donde el EDTA no tuvo efectos negativos sobre la actividad. Las enzimas no dependientes de agentes iónicos (especialmente de  $Ca^{2+}$ ) son candidatas ideales para las aplicaciones industriales. Esto porque durante el paso de licuefacción del almidón, se adiciona  $CaCl_2$  a la mezcla para estabilizar las  $\alpha$ -amilasas a altas temperaturas. Sin embargo, los iones de  $Ca^{2+}$  deben ser removidos por un paso adicional de intercambio iónico porque tienen un efecto inhibitorio sobre la isomerización de glucosa, el cual es el último paso del procesamiento del almidón. Como el pH se ajusta con NaOH, la adición y remoción de  $CaCl_2$  representa un alto costo (Teztrakoglu y col., 2013).

AmiJ33r mantuvo un 60% de actividad en presencia de SDS al 1% (v/v) después de 1h de incubación, por el contrario AmiJ33 fue inhibida bajo las mismas condiciones (Hernández,

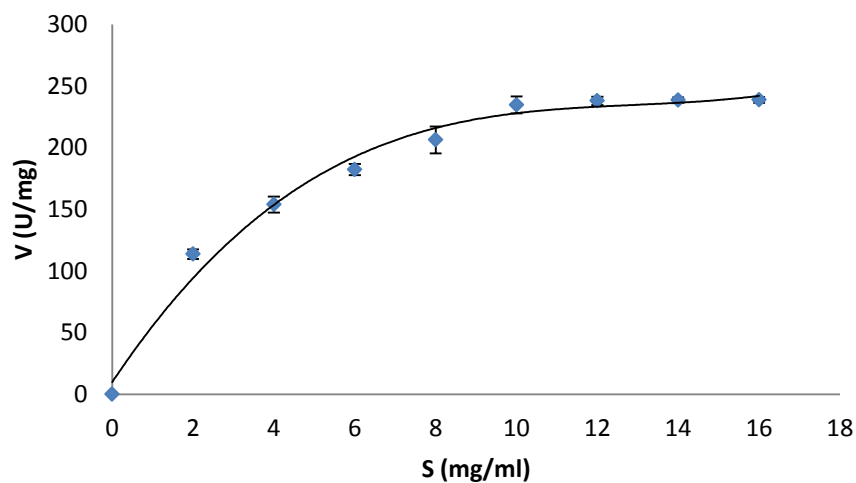
2015). Se ha reportado que solo  $\alpha$ -amilasas termoestables y alcalófilas (Saxena y col., 2007) son estables en presencia de SDS al 1%. Los experimentos de efecto de pH sobre la actividad de AmiJ33r y esta nueva evidencia sugieren que la región extra de aminoácidos en el C-terminal de AmiJ33r le puede estar confiriendo características de una enzima alcalófila. Como resultado, AmiJ33r puede ser propuesta como aditivo en detergentes (Arikan y col., 2008; <http://cime.fcq.unc.edu.ar/laurilsulfato.htm>).

Por otro lado, se sabe que el  $\beta$ -mercaptoetanol puede desnaturalizar algunas proteínas debido a su capacidad para romper puentes disulfuro. Un puente disulfuro se forma por dos grupos sulfhidrilo (-SH), cada uno de ellos perteneciente a un residuo de cisteína. El análisis de la secuencia aminoacídica de AmiJ33r indica que contiene solo una cisteína (Cys84, ubicada en el dominio A) por lo que AmiJ33r no contiene puentes disulfuro, lo cual ya se había sugerido con anterioridad (Montor y col., 2014). Sin embargo, en ausencia de puentes disulfuro, el  $\beta$ -mercaptoetanol puede actuar como un inhibidor competitivo (Yang y col., 1996) o no competitivo (Zhang y col., 2000) dependiendo de la enzima y a altas concentraciones ( $\geq 0.3\%$ ) puede inhibir por completo la actividad (Zhang y col., 2000). Se ha reportado que un exceso de DTT, un análogo del  $\beta$ -mercaptoetanol, puede inducir cambios conformacionales en las enzimas afectando su actividad (Alliegro 2000), por lo que es muy probable que AmiJ33r se haya inhibido por esta razón en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. La presencia de iones como el  $Zn^{2+}$  (Yang y col., 1996) o el  $Ca^{2+}$  (Montor y col., 2014) en el medio de reacción puede tener un efecto protector del  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT e incluso puede reestablecer o incrementar la actividad de enzimas previamente inactivadas (Alliegro 2000).

#### **4.6.5. Determinación de los parámetros cinéticos de AmiJ33r**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración del sustrato en la actividad de AmiJ33r, se determinaron sus parámetros cinéticos,  $K_m$  y  $V_{max}$ . La cinética descrita por AmiJ33r se ajustó al modelo cinético de Michaelis-Menten (fig. 23). Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se determinaron mediante regresión lineal empleando el modelo descrito por Lineweaver-Burk, los cuales fueron de 3.23mg/ml y 294.117 U/mg respectivamente. Sin

embargo, se puede observar que el valor gráfico de  $V_{max}$  no es consistente con el obtenido mediante la regresión lineal por lo que puede ser necesario determinar los parámetros cinéticos mediante otro método.



**Figura 23.** Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de AmiJ33r.

En comparación con trabajos similares AmiJ33r presenta una  $V_{max}$  muy parecida a la reportada para *Bacillus* sp. BKL20 (323U/mg) (Kubrak y col., 2010) y tiene un valor de  $K_m$  muy cercano a los reportados para las  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis* (2.84mg/ml) (Vaseekaran y col., 2010) y *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 (2.34mg/ml) (Gangadharan y col., 2009), lo que indica una alta afinidad de AmiJ33r por el almidón gelatinizado.

## CONCLUSIONES

El gen *amiJ33* se obtuvo a partir de la estrategia propuesta: oligonucleótidos degenerados y secuenciación del genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M. A partir del análisis de la región génica de *amiJ33*, se identificó su promotor y el RBS.

El análisis de la secuencia primaria de AmiJ33r reveló que tiene diferencias estructurales importantes en comparación con otras  $\alpha$ -amilasas, por ejemplo, presenta un dominio A más pequeño y un dominio C más grande. Además, posee una región extra de 176 aminoácidos en el C-terminal. El análisis de la estructura secundaria de la secuencia mostró que AmiJ33r posee 5 hojas  $\beta$  más que otras  $\alpha$ -amilasas, mientras que el análisis 3D mostró que posee un dominio B más pequeño formado por  $\alpha$ -hélices.

Se amplificó la versión completa del gen *amiJ33* con la finalidad de estudiar su comportamiento bioquímico y cinético. El gen *amiJ33* fue clonado en el plásmido pBAD-TOPO y expresado en *E. coli*. A diferencia de otras  $\alpha$ -amilasas, AmiJ33r fue exportada eficientemente al medio extracelular, mostrando que su péptido señal es compatible con la maquinaria celular de *E. coli*.

AmiJ33r mostró diferencias importantes al ser comparada con la enzima nativa AmiJ33. Una de las más importantes fue que AmiJ33r perdió la capacidad de hidrolizar almidón nativo y solo pudo hidrolizar almidón gelatinizado, mientras que AmiJ33 hidroliza ambos. Se necesitó una concentración mayor de sulfato de amonio para precipitar AmiJ33r (80%), en comparación con la cantidad usada para precipitar AmiJ33 (60%), debido al incremento de aminoácidos hidrofílicos en la región extra del C-terminal. Se observaron perfiles distintos de efecto y estabilidad de pH en la actividad de AmiJ33r con respecto a los perfiles de AmiJ33, los cuales sugieren que AmiJ33r es más alcalófila que la nativa. Además, sorprendentemente AmiJ33r mostró 60% de actividad en presencia de SDS 1% (v/v), mientras que bajo las mismas condiciones AmiJ33 se inhibió.

Es muy probable que el  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% (v/v) inhiba la actividad tanto de AmiJ33r como de AmiJ33 debido a modificaciones estructurales que afectan el ambiente

electroestático de ambas, ya que mediante el análisis de la secuencia aminoacídica de AmiJ33r se descartó la formación de puentes disulfuro.

Los resultados indican que la región extra del C-terminal de AmiJ33r tiene efecto sobre la capacidad de hidrólisis del almidón nativo, es posible que esta región interfiera o compita con el SBD de C-terminal, impidiendo la unión de la enzima al almidón nativo por una competencia al formar relaciones electroestáticas con el agua o bien por bloqueo del SBD. La región extra del C-terminal también provocó que la enzima sea estable a pHs alcalinos y al SDS. Por otro lado, esta región no tuvo efecto en la temperatura óptima ni en la termoestabilidad.

## **PERSPECTIVAS**

Construir distintas versiones trucadas de AmiJ33r con la finalidad de evaluar la importancia de las regiones identificadas: N-terminal, región-P y región extra del C-terminal. Generar mutantes para evaluar la función del SBD. Proponer quimeras modificando la posición del SBD hacia el N-terminal y conservar la región extra del C-terminal con la finalidad de obtener una amilasa alcalófila que hidrolice almidón nativo.

Analizar el uso de codones para incrementar la expresión en *E. coli*, o bien, probar otros sistemas de expresión (plásmidos, otras cepas de *E. coli* e incluso otras bacterias) para producir una mayor cantidad de enzima.

Modificar el promotor del microorganismo nativo con la finalidad de incrementar la expresión de la enzima.

Analizar otros genes identificados en el genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M, para determinar el grado de conservación de los péptidos señal y utilizarlos para estudiar la traslocación de proteínas al medio extracelular.

## REFERENCIAS

- Abe A., Yoshida H., Tonozuka T., Sakano Y., y Kamitori S. 2005. Complexes of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -amylase 1 and pullulan model oligosaccharides provide new insight into the mechanism for recognizing substrates with  $\alpha$ -(1, 6) glycosidic linkages. *FEBS J*, 272: 6145-6153.
- Abdu M. M., Neelgund S., Gurumurthy D. M., y Rajeshwara A. N. 2011. Identification, Characterization of Novel Halophilic *Bacillus Cereus* MS6: a Source for Extra Cellular  $\alpha$ -Amylase. *Adv Environ Biol*, 5: 992-999.
- Alliegro C. M. 2000. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with cleland's reagent. *Anal Biochem*, 282: 102-106.
- Arikan B. 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresour Technol*, 99: 3071-3076.
- Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S., y Çolak Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol*, 39: 547-553.
- Ben A., Mezghani M., y Bejar S. 1999. A thermostable  $\alpha$ -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding agent. *Enzyme Microb Technol*, 24: 548-549.
- Betancur D. A. 2001. Caracterización molecular, nutrimental y funcional de almidones de *Phaseolus lunatus* y *Mucuna puriens*. Tesis de doctorado. México D.F. Pág. 48.
- Boraston A. B., Healey M., Klassen J., Ficko B. E., Lammerts B. A y 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. *J Biol Chem*, 281:587-598.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A., y Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem*, 38: 1397-1403.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., y Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl Ac Res*, 37: 233-238.
- Chai Y. Y., Rahman R. N., Illias R. M., y Goh K. M. 2012. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant  $\alpha$ -amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39: 731-741.

Contreras M. B., Sachman R. B., Figueroa P. I. Vinuesa P. 2009. primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 37: 95-100.

Coutinho P. M., y Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En: Gilbert H. J., Davies G., Henrissat B., y Svensson B. (Eds.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. 6ª edición (pág. 3-12). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Devi L. B., Khaund P. y Joshi S. R. 2010. Thermostable amylase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan Range. *Afr J Microbiol Res*, 23: 2534-2542.

Dheeran P., Kumar S., Jaiswal Y. K., y Adhikari D. K. 2010. *App Microbiol Biotechnol*, 86: 1857-1866.

Ganghadaran D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K. M., y Pandey A. 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for  $\alpha$ -amylase production. *Food Technol Biotechnol* 44: 269-274.

Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Sivaramakrishnan S., y Pandey A. 2009. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *App Biochem Biotechnol*, 158: 653-662.

García R. B., Aguilera R. P., Castro H. R., y Rodríguez S. R. 2012. Estructura y función de los dominios de fijación al almidón. *BioTecnología*, 16: 11-23.

García G. M., Quintero R. R., y López-Munguía C. A. 2004. *Biotecnología alimentaria*. 5ª edición (pág. 103). México: Limusa.

Goyal N., Gupta J. K., y Soni S. K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technol*, 37: 723-734.

Hernández H. S. 2015. Caracterización bioquímica y cinética de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, AmyJ33. Tesis de licenciatura en proceso. San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.

Horváthová V. 2001. Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties. *Gen Physiol Biophys*, 20: 7-32

Imberty A., y Pérez S. 1988. A revisist to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers*, 27: 1205-1221.

Jespersen H. M., MacGregor E. A., Henrissat B., Sierks M. R., y Svensson B. 1993. Starch and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J Protein Chem*, 12: 791-805.

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*. *Biologia*, 57: 239-245.

Kakeshita H., Kageyama Y., Ozaki K., Nakamura K., y Ara K. 2012. Advances in Applied Biotechnology. En Petre M. (Ed.), *Improvement of Heterologous Protein Secretion by Bacillus subtilis*. (pág. 145-162) INTECH, DOI: 10.5772/29256.

Katsuya Y., Mezaki Y., Kubota M., y Matsuura Y. 1998. Three-dimensional structure of Pseudomonas isoamylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*, 281: 885-897.

Knegtel R. M., Strokopytov B., Penninga D., Faber O.G., Rozeboom H.J., Kalk K.H., Dijkhuizen L., y Dijkstra B.W. 1995. Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J Biol Chem*, 270: 29256-29264.

Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., y Lushchak A. 2010. Production and properties of α-amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Journal Microbiol*, 56: 279-288.

Lara R. A. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Mex Inge Quím*, 10: 209-223.

Li S., Yanga X., Yanga S., Zhua M., y Wang X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J*, 2: 1-11.

Lineback D. R. 1984. The starch granule organization and properties. *Bakers Digest J*, 13: 16-21.

Mamo G., y Gessesse A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technol*, 25: 433-438.

Mergulhao F. J., Summers D. K., Monteiro G. A. 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*, 23: 177-202.

Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 31: 426-428.

Montor A. J. J. 2013. Caracterización de amilasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar. Tesis de licenciatura. San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. Pág. 14-67.

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 A. J. J., del Moral V. S. T. 2014. Cloning of the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (*amyJ33*), isolated of sugarcane soil. J Chem Biol Phys Sci: Special Issue, 4: 111.
- Montor A. J. J., Sachman R. B., Lozano L., del Moral S. T. 2015. Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJ33M, isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region. Genome Announc, 3: 1.
- Nielsen J. E., y Borchert T. V. 2000. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. Biochimica et Biophys Acta Prot Struct and Mol Enzymol, 1543: 253-274.
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ito S. y Miki K. 2003. Crystal structure of calcium-free  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. Journal Biol Chem, 278: 24818-24824.
- Olempska B. Z. S., Merker R. I., Ditto M. D., y DiNovi M. J., 2006. Food processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. Regul Toxicol Pharmacol, 45: 144-158.
- Olivares I. V. 2003. Estudio de la inulosacarasa de la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* y del gen que la codifica. Tesis de doctorado. Cuernavaca, Morelos, México. Pág. 60.
- Paredes L. O., Bello P. L. A., y López M. G. 1994. Amylopectin: structural, gelatinization and retrogradation studies. Food Chem, 50: 411-418.
- Perera J., Tormo A., y García J. L. 2002. *Ingeniería genética* vol. 2. (Pág. 44-88). Madrid: Síntesis.
- Polaina J. 2004. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. Mensaje Bioquímico. 38: 137-188
- Quintero M. M., Montoya C. O. I., y Gutiérrez S. P. A. 2010. Purification and characterization of a  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus* sp. BBM1. Dyna. 77: 31-38.
- Rabhi E. I., Sadok A., Khalaf N., y 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 Eng Des Sel, 5: 201-209.
- Richardson T. H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., Lam D., Macomber J., Short J. M., Robertson D. E., Miller C. 2002. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable  $\alpha$ -amylase. J Biol Chem, 277: 26501-26507.
- Rodríguez S. R., Morlon G. J., Jore J., Pintado J., Juge N., y Guyot J. P. 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. Appl Environ Microbiol, 66: 3350-3356.

Sajedi R. H., Naderi M., H., Khajeh K., Ahmadvand R., Ranjbar B., Asoodeh A. y Moradian F. 2005. A Ca<sup>2+</sup> independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme Microb Technol*, 36: 666-671.

Salimi A., Fatemeh Y., Marzieh G., Sara D., Hesam T., Sirous G., y Khosro K. 2012. Investigations on Possible Roles of C-Terminal Propeptide of a Ca-Independent  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol*, 22: 1077-1083.

Saxena K. R., Dutt K., Agarwal L., y Nayyar P. 2007. A highly and thermostable alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour Technol*, 98: 260-265.

Sodhi H. K., Sharma K., Gupta J. K., y Soni S. K., 2005. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid- state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem*, 40: 525-534.

Simonen M., y Palva I. 1993. Protein secretion in *Bacillus species*. *Microbiol Rev*, 57: 109-137.

Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., y Pandey A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments. *Food Technol Biotechnol*, 44: 173-184.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., y Crouch R. S. 2005. *Fundamentos de química analítica*. (8ª edición). México: Cengage Learning.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729.

Tester R., Karkalas J., y Qi X. 2004. Starch composition, fine structure and architecture. *J Cer Sci*, 39:151-165.

Tuzlakoglu O. M., Akbulut N., Issever O. S., y Gumusel F. 2013. Ligase-Independent Cloning of Amylase Gene from a Local *Bacillus subtilis* Isolate and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *Appl Biochem Biotechnol*. DOI: 10.1007/s12010-013-0331-y.

Uitdehaag J.C., Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen S.G., y Withers B.W. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nat Struct Biol*, 6: 432-436.

Vaclavick A. V. 2002. *Essentials of food science*. 1ª edición (pág. 45-59). España: Acribia.

Van der Maarel M., Van der Veen B., Uitdehaag H., Leemhuis H., y Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotecnol*, 94: 137-55.

- Vaseekaran S., Balakumar S., y Arasaratnam V. 2010. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ -amylase. *Tropical Agricultural Res*, 22: 1-11.
- Wallace R. B., Shaffer J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., y Itakura K. 1979. *Nucleic Acids Res*, 6: 3543.
- Whistler R. L., Paschall E. F. 1984. Starch: Chemical and technology. En: Whistler L. R., BeMiller N. J., y Paschall F. E (eds), *Molecular structure of starch*. 2<sup>a</sup>. Edición (pág. 153-182). New York and London: Academic Press.
- Yamabhai M., Emrat S., Sukasem S., Pesatcha P., Jaruseranee N., y Buranabanyat B. 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J Biotechnol*, 133: 50-57.
- Yang H., Liu L., Li J., Du G., Chen J. 2012. Cloning, heterologous expression, and comparative characterization of a mesophilic  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus subtilis* JN16 in *Escherichia coli*. *Ann Microbiol*, 62:1219-1226.
- Yang Y., Wang H. R., Zhou H. M. 1996. Kinetics of inhibition of aminoacylase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Pept Protein Res*, 6: 532-538.
- Zang R. Q., Chen Q. X., Zheng W. Z., Lin J. Y., Zhuang Z. L., Zhou H. M. 2000. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Biochem Cell Biol*, 8: 865-872.
- Zobel H. F. 1988. Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Carbohydr Polym*, 59: 443-458.

## **ANEXO I**

Cloning of the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (*amyJ33*), isolated of sugarcane soil.

Juan J. Montor-Antonio, Sandra T. del Moral- Ventura.  
(2014)

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences: Special Issue, 4: 111.

# Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at [www.jcbpsc.org](http://www.jcbpsc.org)

Section A: Food Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT

Research abstract

## Cloning Of The $\alpha$ -Amylase From *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (*amyJ33*), Isolated Of Sugarcane Soil

Juan J. Montor-Antonio<sup>1</sup>; Sandra del Moral\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan. Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec 68301, Oaxaca, México.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan. Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec 68301, Oaxaca, México.

**Abstract:** *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, is a Gram-positive bacterium, which was isolated from the soils cultivated with sugarcane in Papaloapan Basin (Oaxaca, Mexico) and produces an  $\alpha$ -amylase (AmiJ33) interesting for the industry. The cloning the gene (*amyJ33*) that encodes for  $\alpha$ -amylase is presented here. Previously, the PCR amplification of *amyJ33* was carried out using degenerate oligonucleotides. However, the analysis with similar complete genes indicated that the PCR product not encoding for the complete gene. Recently, we sent to sequence the *B. amyloliquefaciens* JJC33M genome by Hiseq2000 and 139 contigs were generated. A 1980 bp sequence was founded at contig 68, which was identified like an  $\alpha$ -amylase gene. The complete *amyJ33* sequence was analyzed by BLASTX. *AmyJ33* gene displayed a high identity (99%) with the  $\alpha$ -amylase gene from *B. siamensis*. The PCR amplification of *amyJ33* from the putative signal peptide to termination codon was carried out using the oligonucleotides FpBT and RpBT. The PCR product was cloned into plasmid pBAD-TOPO® to transform cells of *E. coli* TOP10 and to express AmyJ33. Currently, the experiments needed to biochemically characterization are made.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, sequencing, gene,  $\alpha$ -amylase, cloning

**Corresponding author: Sandra del Moral\***  
smoral@unpa.edu.mx

## **ANEXO II**

Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJ33M, isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region.

J. Montor-Antonio, B Sachman-Ruiz, L. Lozano, S. Del Moral.  
(2015)

Genome Anouncements, 3: 1.

# Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, Isolated from Sugarcane Soils in the Papaloapan Region, Mexico

J. J. Montor-Antonio,<sup>a</sup> B. Sachman-Ruiz,<sup>b</sup> L. Lozano,<sup>c</sup> S. del Moral<sup>a</sup>

Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtpec, Oaxaca, Mexico<sup>a</sup>; Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Jiutepec, Morelos, Mexico<sup>b</sup>; Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico<sup>c</sup>

***Bacillus amyloliquefaciens* strain JJC33M is a bacterium that produces  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) and was isolated from sugarcane soil. Its estimated genome size is 3.96 Mb, and it harbors 4,048 coding genes (CDSs).**

Received 17 December 2014 Accepted 19 December 2014 Published 12 February 2015

**Citation** Montor-Antonio JJ, Sachman-Ruiz B, Lozano L, del Moral S. 2015. Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, isolated from sugarcane soils in the Papaloapan region, Mexico. *Genome Announc* 3(1):e01519-14. doi:10.1128/genomeA.01519-14.

**Copyright** © 2015 Montor-Antonio et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license.

Address correspondence to S. del Moral, smoral@unpa.edu.mx.

A draft genome of *Bacillus amyloliquefaciens* strain JJC33M was obtained by direct sequencing of genomic DNA using Illumina sequencing technology. We isolated *B. amyloliquefaciens* JJC33M from sugarcane soil in the Papaloapan region in Mexico. *B. amyloliquefaciens* JJC33M produces an  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) not dependent on calcium, which may give advantages in the production of syrups; it also has the capability of being stable at 40°C, which means it could be used in the baking industry (1). Recently, the genomes of *B. amyloliquefaciens* DSM7, UCMB5036, and EBL11, which are strains used in industry, have been sequenced (2, 3).

JJC33M was grown on nutrient agar with 1% (P/V) starch medium in a petri dish. The genomic DNA was prepared by a MoBio microbial DNA isolation sample prep kit and sequenced by an Illumina HiSeq 2000 sequencer at Macrogen, Seoul, South Korea. A total of 10.19 million paired-end reads with length of 101 bp were obtained from the sequencing. The raw reads were initially assembled using SPAdes version 3.1.1. The gaps between the contigs and ambiguous patches within the contigs were manually filled by aligning individual reads to the contig ends using in-house programs.

The genome sequence annotation was performed with RAST (4). The draft genome of *B. amyloliquefaciens* JJC33M contains 40 contigs, with a total length of 3,961,663 bp. The genome contains 4,048 protein-coding genes (CDSs), 53 rRNAs, and 89 tRNAs, with a G+C content of 45.7%. Genome analysis revealed that the

genome of *B. amyloliquefaciens* JJC33M has a high similarity to that of strain *B. amyloliquefaciens* IT-45 (identity, 94.57%).

**Nucleotide sequence accession numbers.** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [JTJG00000000](https://doi.org/10.1101/000000). The version described in this paper is version JTJG01000000.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by CONACyT 154683 and the master scholarship of J. J. Montor-Antonio, no. 28094.

## REFERENCES

1. Montor-Antonio JJ, Olvera C, Reyes-Duarte D, Sachman-Ruiz B, Ramirez-Coutiño LP, del Moral S. 2014. Biochemical characterization of the amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of cane sugar soils at the Papaloapan region. *Nova Scientia* 6:39–59. (In Spanish.)
2. Manzoor S, Niazi A, Bejai S, Meijer J, Bongcam-Rudloff E. 2013. Genome sequence of a plant-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* strain UCMB5036. *Genome Announc* 1(2):e00111-13. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00111-13>.
3. Wang Y, Wang X, Greenfield P, Jin D, Bai Z. 2014. Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* EBL11, a new strain of plant growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere. *Genome Announc* 2(4):e00732-14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00732-14>.
4. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.