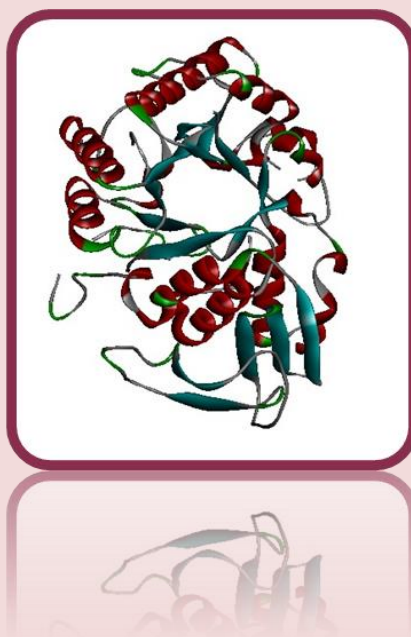


Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

“Caracterización de alfa-amilasas bacterianas”



Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología.

Presentada por: María Florencia Clavijo.

Director: Dr. Diego Gomez-Casati.

Rosario, Argentina

2017

Agradecimientos

- *A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, y a todos los docentes que fueron parte de mi formación.*
- *Al Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, CEFOL. por permitirme realizar mi trabajo de tesina en el instituto.*
- *A la Fundación Banco Santa Fe por haberme otorgado la beca que hizo posible la realización de esta tesina.*

♥ A quienes me acompañaron a lo largo de este trabajo de tesina...

A Diego y Viki por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, transmitirme sus conocimientos y por haber confiado en mi.

A Dieguito, por brindarme parte de su tiempo, por enseñarme, aconsejarme y guiarme en cada momento.

A mis compañeros del lab, por haberme recibido con toda la buena onda. Por hacer los días más divertidos, y por estar presentes cada vez que recurrí a ustedes.

♥ A la persona con quien compartí la mayor parte del tiempo de la carrera...

Barbi, mi compañera de estudio e incondicional amiga. Lo lindo de haberte conocido, y haber transitado esta etapa junto a vos es sentir que me llevo una amiga para toda la vida.

♥ A los de siempre, a los que me vienen acompañando en cada etapa de mi vida: MI FAMILIA.

A mi mamá, quien me bancó, dándome fuerzas, y seguridad. Gracias por tus consejos, tu protección, por confiar en mi y sobre todo por no dejar rendirme...Gracias por tu esfuerzo, este trabajo te pertenece más que nadie más!

A mis abuelos Caco y Mimi, nada de esto hubiera sido posible sin su ayuda. Este era uno de sus mayores deseos, y hoy soy feliz en poder lograrlo. Siempre estarán en mi.

A mi Papá, por tus palabras de aliento, tu presencia y apoyo durante todos estos años.

A mi hermana Cele, por estar incondicionalmente y nunca soltarme la mano.

A mi segunda mamá, que llevo siempre en mi corazón...para vos Choli.

A la personita que llegó en los últimos años de la carrera para robar mi tiempo y corazón: Mi sobrina Simona.

A Kari y Rubén que con su apoyo incondicional me brindaron seguridad.

A mis primas Anto y Alma.

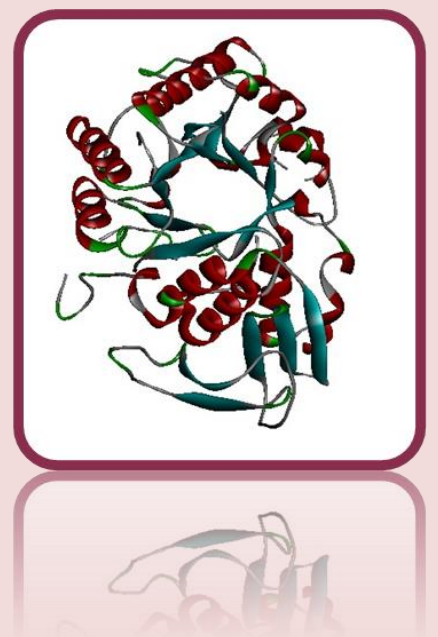
A mis amigas Mari, Agus, Yane y Na.

A Nati, Denis y Dona por brindarme tanto amor, por sus visitas y su compañía.

Presentaciones a congresos y subsidios recibidos

- ✓ Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesina fueron presentados en:
 - III Congreso Regional de Estudiantes de Biotecnología llevado a cabo en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de UNR; en modalidad de póster, bajo el título: “Caracterización de alfa-amilasas bacterianas”, Ma. Florencia Clavijo, Diego A. Peralta; Ma. Victoria Busi; Diego F. Gomez-Casati. Rosario, 30 y 31 de agosto de 2017.
 - Encuentro de jóvenes investigadores (EJI), llevado a cabo en la Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe. En carácter de expositor, bajo el título: “Ingeniería de alfa-amilasas, enzimas para la producción de biocombustibles”, Ma. Florencia Clavijo, Diego A. Peralta; Ma. Victoria Busi; Diego F. Gomez-Casati. Rosario, 4 de octubre de 2017.
 - XI Jornada de Ciencia y Tecnología, UNR. En modalidad de póster, bajo el título: “Ingeniería de alfa-amilasas, enzimas para la producción de biocombustibles”, Ma. Florencia Clavijo, Diego A. Peralta; Ma. Victoria Busi; Diego F. Gomez-Casati. Rosario, 18 de octubre de 2017.
- ✓ Este trabajo de tesina fue financiado por el programa de Becas de Innovación Tecnológica 2016. Fundación Banco Santa Fe.

ÍNDICE



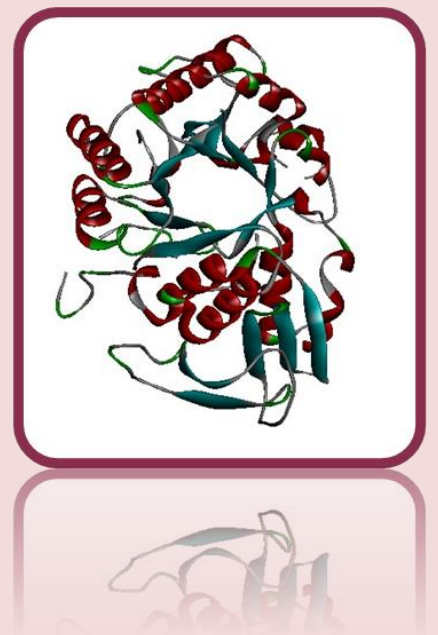
ÍNDICE

Abreviaturas y términos tomados del inglés	1
Resumen	2
1- Introducción	3
1.1- Biocombustibles.....	3
1.2- Almidón	4
1.3- α -amilasas	7
1.4- <i>Saccharophagus degradans</i>	8
1.5- α -amilasa bacteriana de <i>Saccharophagus degradans</i>	9
2- Objetivos	11
2.1- Objetivo general.....	11
2.2- Objetivos específicos	11
3- Materiales y métodos	12
3.1- Cepas bacterianas	12
3.2- Medios de Cultivo	12
3.3- Soluciones, <i>Buffers</i> y reactivos	12
3.4- Antibióticos.....	13
3.5- Vectores plasmídicos	13
3.6- Oligonucleótidos utilizados.....	13
3.7- Enzimas	13
3.8- Detalle de técnicas.....	14
3.8.1- Preparación de bacterias competentes	14
3.8.2- Transformación de bacterias competentes de <i>E. coli</i>	14
3.8.3- Preparación y análisis de ADN	15
3.8.3.1- Aislamiento de ADN plasmídico	15
3.8.3.2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
3.8.3.3- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	16
3.8.4- Preparación y análisis de proteínas.....	17
3.8.4.1- Expresión y purificación de proteínas recombinantes	17
3.8.4.2- Electroforesis unidimensional de proteínas	18
3.8.4.3- Determinación del contenido proteico	18
3.8.4.4- Detección inmunológica: <i>western blot</i>	19

3.8.4.5- Ensayo de unión de la proteína recombinantes a almidón	20
3.8.5- Ensayos de actividad enzimática.....	20
3.8.5.1- Ensayo de actividad enzimática mediante <i>kit</i> comercial.....	20
3.8.5.2- Ensayo de actividad en placa.....	21
3.8.5.3- Efecto del pH y temperatura sobre la actividad α -amilasa	21
3.8.5.4- Cinética enzimática y determinación de parámetros cinéticos ..	22
3.8.6- Estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad α -amilasa	22
3.8.6.1- Inactivación térmica.....	22
3.8.6.2- Efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad y la estabilidad térmica a 50°C de SdAmy y α -amilasa comercial Roche	23
3.9- Métodos Bioinformáticos	23
3.9.1- Análisis de dominios conservados.....	23
3.9.2- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	24
3.9.3- Modelado Molecular	24
4- Resultados y discusión	26
4.1- Estudios bioinformáticos sobre la estructura de la SdAmy	26
4.1.1- Dominios conservados	26
4.1.2- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	32
4.1.3- Modelado molecular de la estructura 3D de la SdAmy	36
4.2- Caracterización bioquímica y cinética de la proteína SdAmy	43
4.2.1- Elución del vector y transformación de células competentes <i>E.coli</i> XL1-Blue.....	43
4.2.2- Obtención del vector pET32a_SdAmy a escala pequeña a partir de las células <i>E.coli</i> XL1-Blue transformadas.....	43
4.2.3- Análisis de inducción del gen <i>SdAmy</i> en las cepas de expresión <i>E. coli</i> BL21 pLysS y <i>E. coli</i> BL21-RIL	44
4.2.3.1- Transformación de ambas cepas de expresión con el vector pET32a_SdAmy	44
4.2.3.2- Inducción de la expresión de la enzima α -amilasa con IPTG	44
4.2.4- Expresión y purificación de SdAmy	46

4.2.5- Ensayos de actividad	49
4.2.5.1- Efecto del pH y temperatura sobre la actividad α -amilasa	49
4.2.5.2- Determinación de la actividad amilolítica de SdAmy y de una α - amilasa comercial	50
4.2.5.3- Determinación de actividad α -amilasa en placa	51
4.2.5.4- Cinética enzimática y determinación de parámetros cinéticos	51
4.2.6- Estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad α -amilasa	52
4.2.6.1- Inactivación térmica.....	52
4.2.6.2- Estudio del efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad y estabilidad térmica de SdAmy y α -amilasa comercial Roche	58
4.2.7- Ensayo de unión de la proteína recombinante SdAmy a almidón ..	64
5- Conclusiones	66
6- Referencias bibliográficas	68

ABREVIATURAS Y TÉRMINOS TOMADOS DEL INGLÉS



Abreviaturas

Amp	ampicilina
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato
c.s.p	cantidad suficiente para
CBMs	módulos de unión a carbohidratos
Cm	cloranfenicol
CPs	polisacáridos complejos
D.O	densidad óptica
DC	dominio catalítico
h.	horas
IPTG	isopropil -D-tiogalactopiranosido
K_m	constante de Michaelis-Menten
min.	minutos
MM	marcador molecular
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
P	<i>pellet</i>
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PDB	<i>protein data bank</i>
r.p.m.	revoluciones por minuto
s.	segundos
SdAmy	gen que codifica para la α -amilasa de <i>S. degradans</i>
SdAmy	Proteína α -amilasa de <i>S. degradans</i>
SN	sobrenadante
Tet	Tetraciclina
V_{max}	Velocidad máxima

Términos tomados del inglés

Buffer

Colony

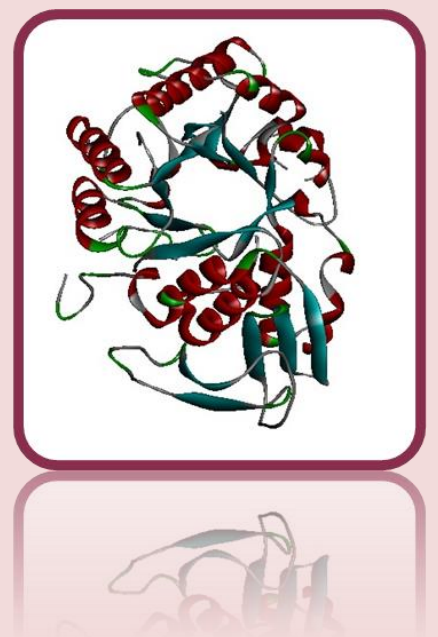
Kit

Page

Pellet

Score

RESUMEN



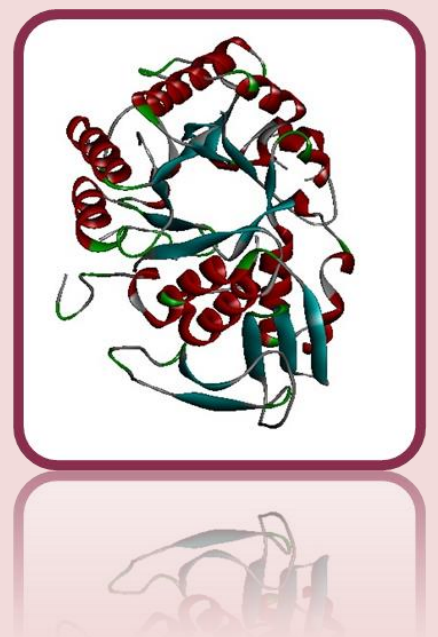
Resumen

Con los avances en biotecnología, el uso de enzimas recombinantes se ha expandido notablemente. Particularmente, el uso de las amilasas se ha expandido en muchos campos como la química clínica, medicinal y de análisis, así como su amplia aplicación en industrias textiles, alimentarias, de fermentación, farmacéuticas, y en la producción de biocombustibles.

Sus propiedades como estabilidad térmica, perfil de pH, de temperatura, y Ca^{2+} -independencia son importantes para sus aplicaciones. De este modo, es de alto interés la identificación y caracterización de nuevas enzimas que presenten una mejor actividad biológica y propiedades diferenciales para ser aplicadas a diferentes procesos.

En este trabajo hemos identificado una α -amilasa de *Saccharophagus degradans* y llevado a cabo la caracterización bioquímica y cinética de la proteína recombinante SdAmy y se la comparó con una enzima comercial (α -amilasa de Roche de páncreas de cerdo, # 10 281 700 110). En primer lugar se llevó a cabo la expresión y purificación de SdAmy. Determinamos que presenta un pH óptimo de 5 y una temperatura óptima de 40°C. Su cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten presentando una V_{max} de $0,04 \pm 0,01 \text{ UA} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y una K_m de $0,34 \pm 0,09 \text{ g.l}^{-1}$. Se ensayó además el efecto de algunos metabolitos como la acarbosa, que actúa como inhibidor, la maltosa, que produce inhibición por producto y se ensayó además el efecto del Ca^{2+} , comprobándose que SdAmy no es Ca^{2+} -dependiente. La enzima presentó una mayor estabilidad térmica respecto a la observada para la enzima comercial y además el agregado de Ca^{2+} mejoró significativamente la estabilidad, reteniendo casi la totalidad de su actividad luego de ser incubada una hora a 50°C.

INTRODUCCIÓN



1- Introducción

1.1- Biocombustibles

Los biocombustibles son alcoholes, ésteres y otros compuestos químicos que son producidos a partir de la biomasa, residuos de la agricultura, de la actividad forestal, y de desechos industriales, como los desperdicios de la industria alimenticia. Entre los biocombustibles podemos incluir al bioetanol, biodiésel, biometanol y otros, siendo los dos primeros los más desarrollados y empleados [1].

Actualmente se utilizan tres tipos de materias primas de origen biológico para la producción a gran escala de etanol: las que contienen sacarosa (caña de azúcar, remolacha, melazas y sorgo dulce); las que contienen almidón (maíz, papa y yuca); y las que contienen celulosa (madera y residuos agrícolas) [2].

La producción de biocombustibles ha cobrado en el último tiempo gran relevancia a nivel nacional e internacional. La generación y el uso de biomasa para este objetivo plantea la competencia por los recursos naturales entre alimentos y energía, circunstancia que ha impulsado la aparición de biocombustibles de “primera generación” (producidos a partir de los cultivos principales, de cosechas que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado), “segunda” (producidos a partir de cultivos alternativos y en base a la degradación de residuos lignocelulósicos, es decir materia prima que no pueden destinarse para la alimentación), y “tercera” (a partir de organismos genéticamente modificados) [3].

La biomasa vegetal está compuesta principalmente de hidratos de carbono como sacarosa y almidón; y por los componentes de la pared celular, como celulosa, hemicelulosas, pectinas y ligninas. Sin embargo, a diferencia del almidón y la sacarosa, la lignocelulosa requiere de pretratamientos costosos para acceder a sus componentes, lo que constituye un obstáculo considerable para su utilización. De esta forma, debe destacarse que si bien el aprovechamiento de los mismos presenta un gran potencial, el mismo se ha visto retrasado debido a que aún se requieren innovaciones importantes tanto a nivel de adaptación de sustratos como en la mejora de las enzimas involucradas en la hidrólisis de estos sustratos [4].

En la figura 1 se muestra un esquema de las distintas etapas presentes en la producción de biocombustibles (específicamente bioetanol). El paso crítico es el tratamiento enzimático con amilasas, y debido a que el costo de las enzimas

utilizadas representa entre el 20 – 25% del costo total, surge la necesidad de identificar nuevas enzimas de diferentes organismos como así también mejorar la eficiencia catalítica y estabilidad de las mismas mediante técnicas de genética y biología molecular.

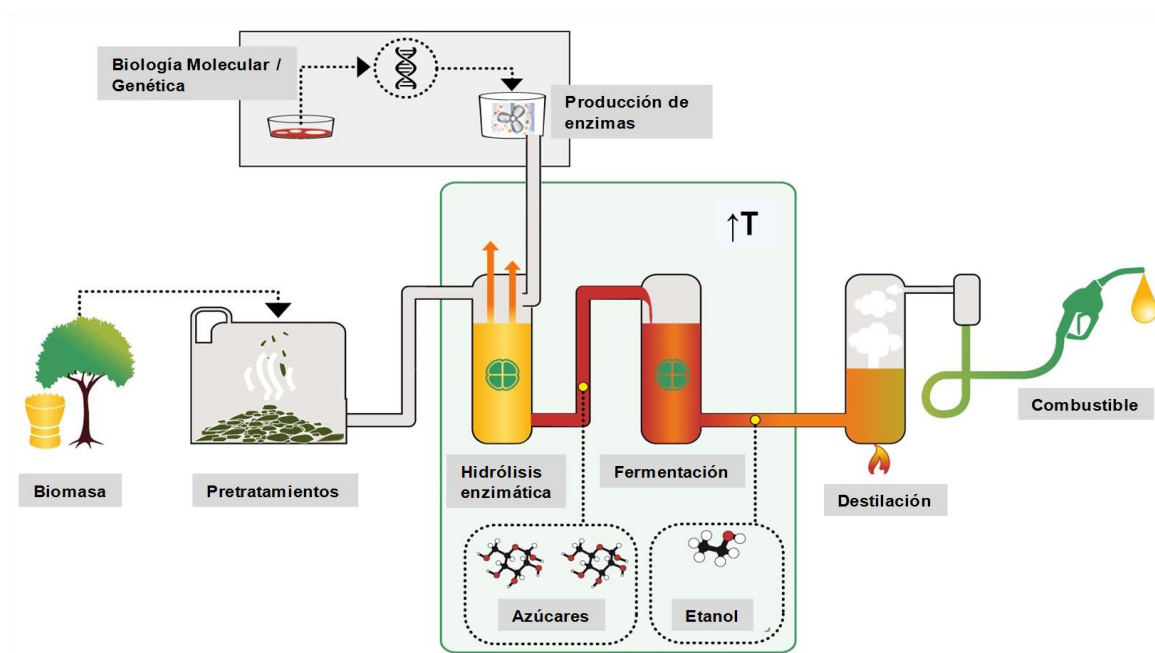


Figura 1. Esquema de las distintas etapas en la producción de bioetanol. Imagen extraída de www.paulvandecruys.wordpress.com

1.2- Almidón

El almidón es la reserva de carbohidratos más abundante de las plantas encontrándose en las hojas, flores, frutas, semillas, diferentes tipos de tallos y raíces. Es utilizado por las mismas como fuente de carbono y energía [5].

Los orgánulos responsables de la síntesis de almidón son los cloroplastos en hojas verdes y los amiloplastos en tejidos de reserva [5, 6]. La producción de almidón en el cloroplasto es diurna y es realizada rápidamente por la planta. Por el contrario, las reservas de almidón producidas en los amiloplastos se depositan durante varios días, o incluso semanas. El almidón se almacena y se moviliza cíclicamente durante la germinación de la semilla, la maduración de los frutos y el brote de tubérculos [7].

Este polisacárido tiene un papel central en la distribución de carbono de la mayoría de las plantas, y su función biológica cambia durante el desarrollo y en respuesta al medio ambiente.

A lo largo de la vida de una planta, el almidón desempeña una doble función en la distribución del carbono; actuando como “fuente”, liberando reservas de carbono en hojas para el crecimiento y desarrollo, y como “sumidero”, ya sea dedicando a almacenar almidón (en semillas y tubérculos), o como reserva temporal en órganos como las flores, las frutas y el desarrollo de semillas sin almidón [8].

La presencia de almidón en los tejidos y órganos de la planta tiene gran impacto sobre su fisiología ya que su síntesis y degradación proveen la disponibilidad de azúcares libres, que a su vez controlan varios procesos de crecimiento y desarrollo [8].

Las principales fuentes de almidón son los cereales, las raíces, los tubérculos, las legumbres y algunas frutas inmaduras como los plátanos o los mangos [9].

El almidón es sintetizado por las células vegetales, a partir de ADP-glucosa mediante una combinación de diferentes enzimas como la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGlc PPasa), almidón sintasas (SS) y enzima ramificante (SBE), de las cuales existen múltiples isoformas en plantas. Además existen otras enzimas que participan en este proceso de síntesis como las enzimas desramificantes (isoamilasas y pululanases) que eliminan los puntos de ramificación en exceso, mientras que otras enzimas degradativas (α -amilasas) recortan las cadenas, dando lugar a la formación de amilopectina [10].

Dos tipos de polímeros de glucosa están presentes en el almidón: la amilosa y la amilopectina. La amilosa y la amilopectina tienen diferentes estructuras y propiedades. La amilosa es un polímero lineal que consta de hasta 6000 unidades de glucosa unidas a través de enlaces α -1,4 glucosídicos, mientras que la amilopectina es un polímero ramificado de cadenas lineales de 10-60 unidades de glucosa unidos por enlaces α -1,6 a las cadenas laterales con 15-45 unidades de glucosa [5, 11]

En la figura 2 se muestran las unidades estructurales del almidón: amilosa y amilopectina. La distribución polimodal de cadenas de α -glucanos de diferentes tamaños y la agrupación de los puntos de ramificación en la molécula de amilopectina permiten la formación de dobles cadenas helicoidales. De esta manera,

la amilosa y la amilopectina se pueden disponer en una estructura semicristalina que forma una matriz de gránulos de almidón con material amorfo (amilosa) y cristalino (amilopectina) alternado. Esta estructura altamente organizada es responsable de la insolubilidad del gránulo de almidón [9].

La longitud de las cadenas de α -glucano, la relación de amilosa-amilopectina y el grado de ramificación de la amilopectina definen el tamaño, la estructura y la utilidad particular de los gránulos de almidón en cada especie de planta. Otras características asociadas con el gránulo, como la forma, el tipo de superficie y los grupos de fosfato, influyen en las propiedades y usos del almidón [5].

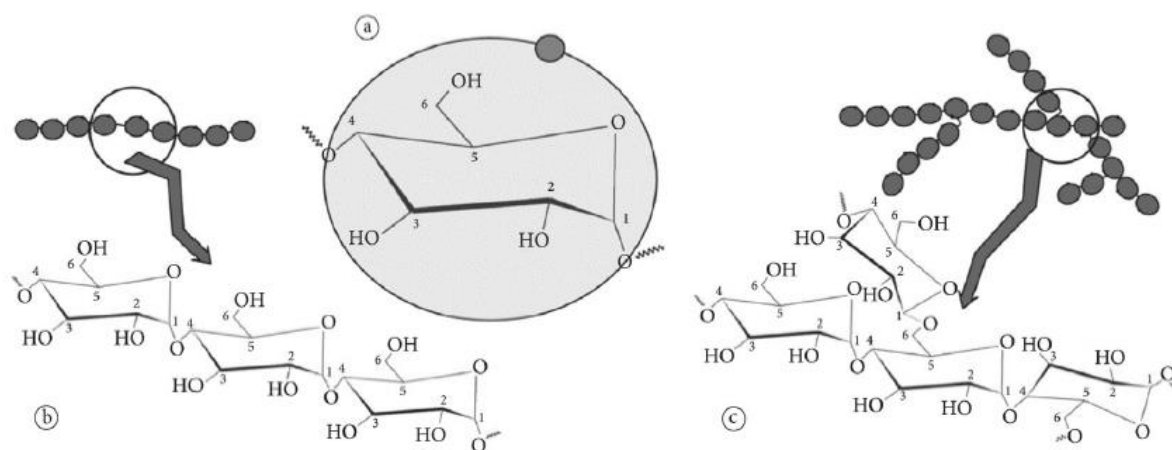


Figura 2. Diseño estructural básico de (a) unidades de glucosa, (b) amilosa y (c) amilopectina, junto con el etiquetado de los átomos y los ángulos de torsión. La extensión de las unidades básicas a las estructuras macromoleculares fue adaptada de Pérez y Bertoft (2010).

El almidón se utiliza en diversas aplicaciones industriales, como espesante de alimentos, y materia prima para la producción de bioetanol, así como en la industria cervecera. Es un componente importante de la dieta humana y, para este fin, se lo somete a transformaciones tanto químicas como enzimáticas para producir una gran variedad de productos, tales como hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa, fructosa, maltodextrina derivados o ciclodextrinas, que se utilizan en la industria alimentaria. Además de esto, los azúcares producidos se pueden fermentar para producir bioetanol [10, 12].

Para su conversión en bioetanol, el almidón debe ser primero hidrolizado en azúcares simples. Para tal fin se utiliza una técnica que implica entre otras variables, el uso de enzimas tales como una glucoamilasa (EC 3.2.1.3) y una α -amilasa (EC 3.2.1.1) y así romper el polímero para producir dextrinas solubles.

1.3- α - amilasas

Las α -amilasas (E.C.3.2.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos presentes en el almidón para producir moléculas de bajo peso molecular, tales como unidades de glucosa, maltosa y maltotriosa [13].

Las amilasas se encuentran entre las proteínas de alta relevancia para la biotecnología, constituyendo una clase de enzimas industriales que abarcan aproximadamente el 25% del mercado mundial de proteínas nativas y recombinantes [14].

Estas enzimas se pueden obtener de varias fuentes, tales como plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, aquellas procedentes de fuentes fúngicas y bacterianas son las que han dominado aplicaciones en sectores industriales. Hoy en día, un gran número de amilasas microbianas están disponibles comercialmente.

Con los avances en biotecnología, la aplicación de las amilasas se ha expandido en muchos campos como la química clínica, medicinal y de análisis, así como su amplia aplicación en la sacarificación del almidón, en industrias textiles, alimentarias, de fermentación, farmacéuticas y en la producción de biocombustibles, sustituyendo casi por completo la hidrólisis química del almidón [14].

La principal ventaja de la utilización de microorganismos para la producción de amilasas es la mayor capacidad de producción y el hecho de que los microbios son fáciles de manipular para obtener enzimas de características deseadas [13]. La producción de α -amilasas es esencial para la conversión de los almidones en oligosacáridos. Las enzimas de degradación del almidón se utilizan en la producción de maltodextrinas, almidones modificados, o jarabes de glucosa y fructosa.

Las propiedades de cada α -amilasa tales como estabilidad térmica, perfil de pH, de temperatura, y Ca^{2+} -independencia son importantes para sus aplicaciones en la industria. De esta forma, es de alto interés la identificación y caracterización de

nuevas enzimas que tengan una mejor actividad biológica y propiedades diferenciales para ser aplicadas a diferentes procesos [14].

Dentro de este contexto, se propuso como objetivo general de este trabajo de tesina de licenciatura, realizar una caracterización bioquímica y cinética de una enzima clave para la degradación de almidón: una α -amilasa bacteriana de *Saccharophagus degradans*. Para ello se ha realizado previamente un estudio de inteligencia tecnológica para identificar organismos que posean proteínas con mayor actividad específica como *S. degradans*, donde el gen de interés será sintetizado en sistemas de expresión bacterianos para la producción de la proteína recombinante.

1.4- *Saccharophagus degradans*

- *Saccharophagus*: Saccharon (azúcar), phagus (devorador) → devorador de azúcar.
- *degradans*: degradador, habilidad para degradar varios polisacáridos complejos (CPs).

Saccharophagus degradans es una bacteria marina gram-negativa, se lo considera el degradador marino más versátil ya que tiene una alta capacidad de degradar polisacáridos simples y complejos como fuente de energía [15, 16]. Recientemente se demostró que esta bacteria además tiene la capacidad de fermentar la xilosa a etanol [17, 18].

Puede degradar al menos 10 CPs como agar, alginato, quitina, celulosa, fucoidano, laminarina, pectina, pululano, almidón y xilano. Estos CPs son derivados de numerosas fuentes, incluyendo algas, plantas terrestres, crustáceos, bacterias y hongos. La versatilidad de degradar CPs es única a comparación de los grupos *Microbulbifer* y *Teredinibacter* [15, 16].

El análisis genómico predijo que tiene más de 130 marcos abiertos de lectura que codifican enzimas involucradas en la despolimerización de CPs. Además, es probable que al menos otros 100-200 genes estén implicados en la señalización, la regulación y el metabolismo adicional de CPs [16].

Las células son varillas pleomórficas, con un promedio de 1,5-3,0 μm de largo y 0,5 μm de ancho durante la fase exponencial de crecimiento en glucosa. Las colonias

son de color crema y luego se vuelven negras por la producción de eumelanina [16]. En los medios que contienen polisacáridos complejos como fuentes únicas de carbono, las células pueden producir protuberancias superficiales y vesículas (figura 3). Cuando crecen en condiciones de alta salinidad forman espirales y filamentos.

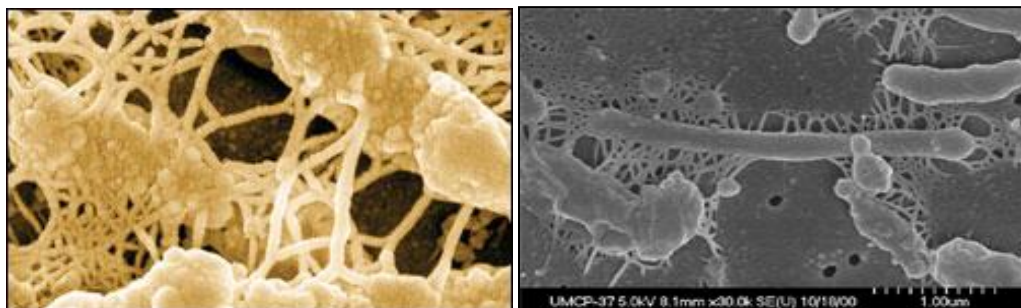


Figura 3. Microfotografía de *S. degradans*, bacteria marina gram-negativa. Degrada gran variedad de polisacáridos simples y complejos (agar, alginato, quitina, celulosa, fucoidano, laminarina, pectina, pululano, almidón, y xilano). Imagen extraída de www.microbewiki.edu

El rango de temperatura para su crecimiento es de 4-37°C con una temperatura óptima de 30°C. El pH óptimo es 7,5 con un rango de 4,5-10 y además requiere de sales marinas.

Para sus estudios la misma fue aislada del césped marino *Spartina alterniflora* en la Bahía inferior de Chesapeake, Condado de Mathews, EE.UU [16].

1.5- α -amilasa bacteriana de *Saccharophagus degradans*

Recientemente fue identificado un gen que codifica para una α -amilasa putativa de *S. degradans* (locus WP_011469411) compuesta por 563 residuos aminoacídicos y que hasta el momento no había sido caracterizada.

En la figura 4 se muestra un esquema de la estructura de la proteína α -amilasa de *S. degradans*; la misma presenta tres dominios: Dominio catalítico, DC, en la región N-terminal; dominio C conservado, Amy_C, en la región central de la proteína y módulo de unión a carbohidratos perteneciente a la familia 20, CBM20 en el extremo C-terminal de la proteína, entre los aminoácidos 467-563 [19]. Un CBM se define como una secuencia contigua de aminoácidos dentro de una enzima activa sobre carbohidratos, que posee un plegamiento característico y la capacidad de unirse al sustrato. Están constituidos generalmente por 30 a 200 aminoácidos y pueden presentarse como dominios simples, dobles o triples, tanto en el extremo N- como C-

terminal de la proteína, aunque ocasionalmente se los ha encontrado en una posición central [20].

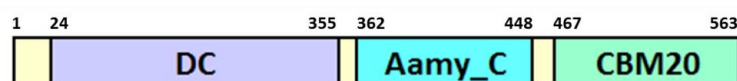


Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína α -amilasa de *S. degradans*. Los números en la parte superior indican la posición de los aminoácidos que determinan el comienzo y finalización de cada una de las regiones descriptas.

En este trabajo, presentamos la caracterización de la enzima recombinante de α -amilasa de *S. degradans*, SdAmy, llevando a cabo la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima y analizando sus propiedades bioquímicas.

El gen *SdAmy* fue sintetizado mediante la compañía Genscript (USA) (<http://www.genscript.com/>) en el plásmido pET32a, con los codones optimizados para la expresión en *E. coli*. Dicha construcción se la denominó pET32a_SdAmy.

La figura 5 muestra un esquema de la estructura del gen *SdAmy* recombinante en el vector pET32a. Además de los tres dominios pertenecientes a SdAmy, se le añadieron sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y XhoI; sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, *Tabacco Etch Virus*; un tag de 6 histidinas; y el codón STOP.

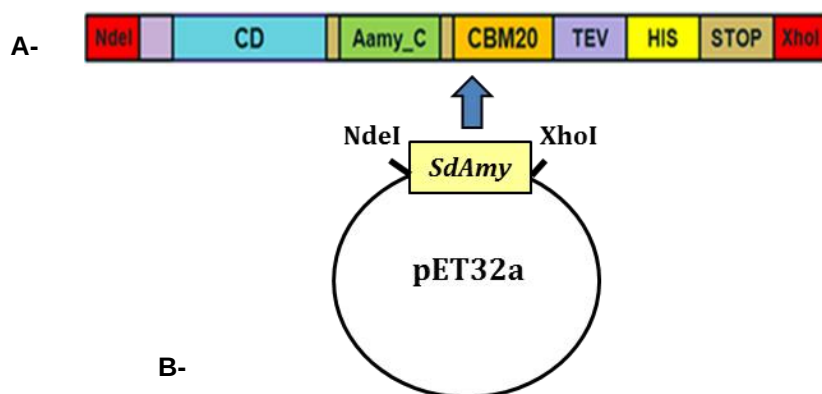
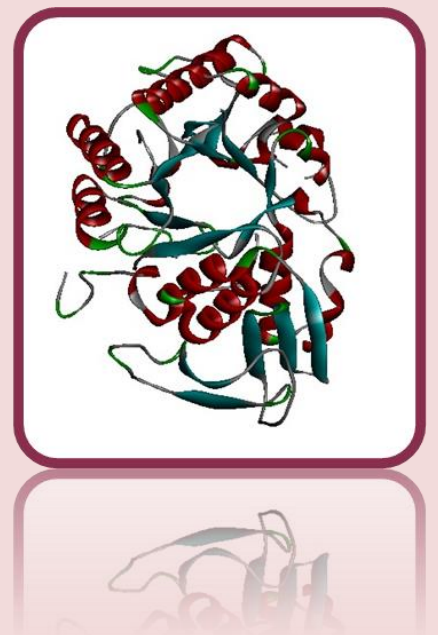


Figura 5. A- Esquema de la estructura del gen *SdAmy* recombinante: CD (dominio catalítico), Aamy_C (dominio C conservado), CBM20 (módulo de unión a carbohidratos perteneciente a la familia 20), TEV (sitio de reconocimiento de proteasa TEV, *Tobacco Etch Virus*), HIS (tag de 6 histidinas), STOP (codón stop), NdeI y XhoI (sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y XhoI). B- Esquema del plásmido pET32a con el gen de la α -amilasa recombinante SdAmy.

OBJETIVOS



2- Objetivos

2.1- Objetivo general

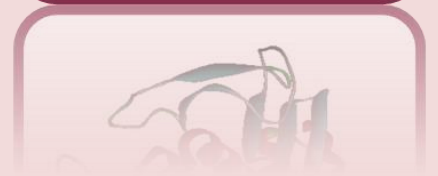
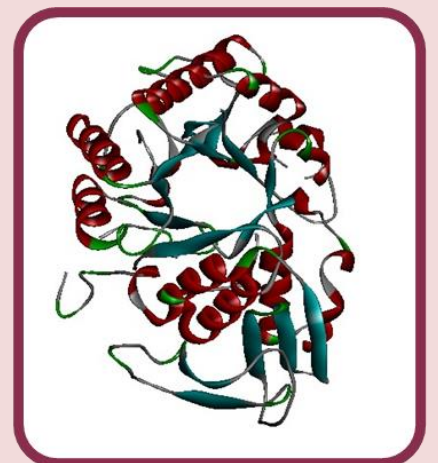
Caracterizar bioquímica, cinética y estructuralmente una α -amilasa de la bacteria marina *Saccharophagus degradans*.

2.2- Objetivos específicos

Dicho objetivo general pretende alcanzarse a partir de los siguientes objetivos específicos:

- 1) Realizar análisis bioinformático “*in silico*” de los dominios conservados, análisis filogenético y llevar a cabo el modelado molecular de la proteína α -amilasa de *S. degradans*.
- 2) Expresar y purificar la α -amilasa de *S. degradans* (SdAmy, locus WP_011469411). Determinar el pH y temperatura óptima de la enzima como así también sus parámetros cinéticos.
- 3) Evaluar la estabilidad térmica de SdAmy. Determinar el efecto de diferentes metabolitos sobre la estabilidad de la enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS



3- Materiales y Métodos

3.1- Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron diferentes cepas de *Escherichia coli*. Se describe a continuación cada cepa y el genotipo descrito para ella:

- ***E. coli* XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIZ ΔM15 Tn10* (Tet^r)].
- ***E. coli* BL21 (DE3) pLysS:** F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, (Cm^r)*.
- ***E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL:** F⁻ *ompT hsdSB (r_B⁻, m_B⁻), dcm⁺ Tet^r Gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cm^r]*.

Las cepas de *E. coli* se incubaron con agitación a 37°C en medio Luria-Bertani (LB), conteniendo los antibióticos apropiados para cada caso.

3.2- Medios de Cultivo

Medio LB (Luria Bertani): Triptéina 10 g; Extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; Agua c.s.p. 1 litro. pH 7,0.

Medio LB agar: medio LB con el agregado de 15 g/l de agar.

3.3- Soluciones, *Buffers* y reactivos

10 X TBE Buffer: Tris-base 108 g; ácido bórico 55 g; 0,5 M EDTA; agua c.s.p. 1 litro. pH 8,0.

TE Buffer: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; agua c.s.p. 800 ml; ajustar pH 8 con HCl; Agua c.s.p. 1 litro.

10 X PBS: NaCl 80 g; KCl 2 g; Na₂HPO₄·7H₂O 26,8 g; KH₂PO₄ 2,4 g; agua c.s.p. 800 ml; HCl hasta pH 7,4; agua c.s.p. 1 litro.

3.4- Antibióticos

Antibiótico	Concentración en Stock	Concentración en cultivo
Ampicilina (Amp)	100 mg/ml	100 µg/ml
Cloranfenicol (Cm)	30 mg/ml	30 µg/ml
Tetraciclina (Tet)	20 mg/ml	15 µg/ml

3.5- Vectores plasmídicos

El vector plasmídico comercial utilizado durante este trabajo de tesina fue obtenido de la compañía Genscript (USA) (<http://www.genscript.com/>). El gen *SdAmy* fue sintetizado en el plásmido pET32a (Amp^r), con los codones optimizados para la expresión en *E. coli*. Dicha construcción se la denominó pET32a_ *SdAmy* (figura 5).

3.6- Oligonucleótidos utilizados

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo son las siguientes:

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Gen	Sitio
NdeIAmySd UP	CATATGCGTAAGCTGACCCAGCTGTTC	<i>SdAmy</i>	NdeI
XhoISTOPHisAmySd down	CTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTG	<i>SdAmy</i>	XhoI

3.7- Enzimas

α -amilasa comercial Roche # 10 281 700 110 de páncreas de cerdo; enzima comercial utilizada como control positivo en ensayos de actividad.

3.8- Detalle de técnicas

3.8.1- Preparación de bacterias competentes

La transformación es una de las técnicas que se utiliza para la introducción de ADN plasmídico dentro de una célula bacteriana, pero para que el proceso sea eficiente, es necesario hacer a las bacterias competentes, es decir, aumentar su capacidad de ingresar ADN del medio ambiente que la rodea.

Las células fueron sembradas en placa de LB-agar suplementadas con el antibiótico adecuado, y fue incubada toda la noche a 37°C. Una vez crecidas las colonias se tomó una de ellas y se inoculó en 3 ml de medio LB que fue incubado durante toda la noche a 37°C, con agitación.

Posteriormente, 1 ml de este cultivo líquido se utilizó para inocular 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, $D.O_{600nm} = 0,40-0,60$ (determinada por cuantificación de la Densidad Óptica (D.O.) a 600nm). Después de separar en dos fracciones de 50 ml en tubos estériles, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a 4°C. El precipitado de células fue resuspendido en 12,5 ml de $MgCl_2$ 0,1 M frío, y posteriormente centrifugado a 4000 rpm durante 3 min. a 4°C.

Luego se resuspendieron las células en 12,5 ml de 0,1 M $CaCl_2$ frío, y se incubaron durante 30 min. a 4°C. Se volvió a centrifugar a 4000 rpm por 3 minutos a 4°C, y finalmente el precipitado de células se resuspendió en 2 ml de la solución que contiene $CaCl_2$ 0,1 M y glicerol 15% (V/V). Las células se fraccionaron en alícuotas de 100 μ l que fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

3.8.2- Transformación de bacterias competentes de *E. coli*

Se transformaron 100 μ l de células competentes de *E. coli* (XL1-Blue o BL21 RIL/pLysS, según corresponda) con 1 μ l de ADN plasmídico pET32a_SdAmy. Las células se incubaron durante 30 min. en hielo. Posteriormente, la mezcla fue sometida a un *shock* térmico (45 s. a 42°C) y se enfrió rápidamente en hielo por 15 min. Transcurrido este tiempo, se agregó 600 μ l de medio LB y se incubó 45 min. a 37°C con agitación. Finalmente, las bacterias transformadas fueron crecidas a 37°C toda la noche en placas conteniendo medio LB-agar suplementadas con los

antibióticos adecuados (Amp-Cm/Tet). La resistencia al antibiótico ampicilina fue conferida por el plásmido pET32a_SdAmy.

3.8.3- Preparación y análisis de ADN

3.8.3.1- Aislamiento de ADN plasmídico:

- Aislamiento de ADN plasmídico (*kit* comercial)

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el equipo comercial “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), según las instrucciones del fabricante, obteniéndose ADN libre de ARN.

- Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

El aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina se realizó según el método de Sambrook con algunas modificaciones [21]. Se centrifugó durante 1 min. a 13000 rpm. 3 ml de cultivo (crecido toda la noche a 37°C en LB suplementado con el antibiótico ampicilina). Después de retirar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con el agregado de 200 µl de solución P1 (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0) y agitación con vortex. Se adicionó 400 µl de solución P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1% (P/V)) y se mezcló por inversión, hasta clarificar. Posteriormente se agregó 300 µl de solución P3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5, Ácido acético glacial 11% (V/V)), se mezcló rápidamente por inversión. Se centrifugó durante 5 min. a 13000 rpm. El sobrenadante fue transferido a otro tubo, al que se le agregó igual volumen de cloroformo (400 µl), se agitó por inversión y se dejó reposar 3 min.

La fase superior se transfirió a otro tubo y para lograr la precipitación del ADN plasmídico se agregó 600 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y la mezcla fue incubada a -20 °C durante 30 min. Luego de centrifugar a 13000 rpm durante 10 min. a 4°C se retiró el sobrenadante, se agregó 500 µl de etanol 70% (V/V) y se centrifugó durante 5 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y el ADN se resuspendió en 40 µl de *buffer* TE 0,1X o agua destilada.

3.8.3.2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la amplificación del gen *SdAmy* con el fin de verificar la presencia del mismo en los ADN plasmídicos obtenidos de las mini-preparaciones y para los análisis por *colony* PCR (PCR utilizando una colonia bacteriana como molde). Para todos los ensayos se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Green Go Taq Buffer 5X	5,00 µl
dNTPs 10Mm	0,50 µl
Oligonucleótido 5' (0,1 µg/µl)	0,50 µl
Oligonucleótido 3' (0,1 µg/µl)	0,50 µl
GO Taq Polimerasa (5 µg/µl)	0,13 µl
ADN	1,00 µl
H ₂ O	15,38 µl
Volumen final	23,00 µl

El protocolo general para la amplificación constó de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min. 26 ciclos:

- Fase de desnaturalización a 94°C 40 s.
- Fase de hibridación a 60°C durante 40 s.
- Fase de elongación 72°C durante 1 min. 50 s.
- Extensión final de 10 min. a 72°C.

3.8.3.3- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de las reacciones de PCR y de las mini-preparaciones de ADN plasmídico se realizó una electroforesis en geles de agarosa 0,8% (P/V) con SYBR Green (5 mg/ml). Estos geles fueron sometidos a electroforesis horizontal en un campo eléctrico a voltaje constante (100-120 V) utilizando el *buffer* TBE 1X. Los fragmentos de ADN fueron visualizados en un transiluminador UV y sus tamaños fueron determinados por comparación con marcadores de tamaño molecular comerciales (GeneRuler™ DNA Ladder Mix; y λ EcoRI + HindIII; Productos Bio-Lógicos, UNQ).

3.8.4- Preparación y análisis de proteínas

3.8.4.1- Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante SdAmy, se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 RIL y BL21 pLysS con el plásmido pET32a_SdAmy que contienen el gen que codifica la proteína de interés.

Se inoculó a partir de una colonia positiva (transformada con pET32a_SdAmy) un medio LB suplementado con ampicilina, que fue crecido toda la noche a 37°C con agitación a 160 rpm.

A partir del pre-inóculo anterior se inocularon medios LB de 150 ml y 250 ml suplementados con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 3 h. en agitación, hasta una $D.O._{600nm}=0,40-0,60$ (determinada por cuantificación de la Densidad Óptica (D.O.) a 600nm).

La inducción se llevó a cabo mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron a 18°C durante 2 h. con agitación a 180 rpm (la cepa y el tiempo óptimo de expresión fueron seleccionados luego del análisis por SDS-PAGE de muestras tomadas a diferentes tiempos post-inducción). La evaluación de la inducción se llevó a cabo tomando muestras de 1 ml a diferentes tiempos luego de la inducción que fueron centrifugadas a 13000 rpm a 4°C durante 1 min., se descartó el sobrenadante y las células precipitadas fueron resuspendidas en 90 μ l de agua destilada y se le añadieron 18 μ l de *sample buffer*. Finalmente las muestras fueron incubadas a 100°C durante 15 minutos para luego ser analizadas mediante SDS-PAGE.

Finalmente, las células inducidas fueron precipitadas por centrifugación 15 min. a 5000 rpm a 4°C, y fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

La purificación proteica se realizó mediante cromatografía de afinidad en columna comercial de Sefarosa-Ni (HiTrap™ Chelating HP, Amersham Biosciences); ya que la proteína se expresa fusionada a un *tag* de 6 histidinas en el extremo C-terminal.

Las células guardadas a -20°C fueron lavadas y resuspendidas en *buffer* de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 0,5 mM; Imidazol 20 mM.), y luego se les añadió un inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM.

Las células se rompieron utilizando un ultrasonificador (VCX130, Sonics and Materials Inc., Connecticut, USA) y posterior centrifugado a 13000 rpm durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante fue cargado a la columna, previamente equilibrada con 3 ml de agua filtrada (flujo 1 ml/min), y con 5 ml de *buffer* de unión (flujo 1 ml/min).

Las proteínas unidas a la columna fueron eluídas (flujo 0,6 ml/min) por un gradiente lineal de *buffer* de unión y *buffer* de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM) y recolectadas en fracciones de 1 ml a las que se les adicionó 200 µl de glicerol.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE para seleccionar aquellas que presentaran la proteína de interés.

3.8.4.2- Electroforesis unidimensional de proteínas

El análisis de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fue llevado a cabo con un equipo Mini Protean (Bio-Rad) usando geles de poliacrilamida/bisacrilamida con una concentración de 12% (P/V) para geles de resolución y 5% (P/V) para los geles de separación, como ha sido previamente descrito por Laemmli (1970) [22].

Las muestras se incubaron a 100°C durante 15 min. en presencia de *sample buffer* (Tris-HCl 12 Mm pH 6,8; glicerol 5% (V/V); SDS 0,4% (P/V); 2-mercaptoetanol 2,88 mM y azul de bromofenol 0,02% (P/V)). La corrida electroforética se realizó a 180 V (voltaje constante).

Los geles fueron revelados por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (R250, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y el desteñido se llevó a cabo incubándolo en agua a 100°C o bien por el método de desteñido que consiste en lavarlo en una solución de metanol:acético:agua (1:1:18).

La masa molecular de la proteína fue determinada por comparación con marcadores de masa molecular.

3.8.4.3- Determinación del contenido proteico

La totalidad de las proteínas fue determinada por el método de Bradford [23] en el cual se tomaron concentraciones crecientes conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (BSA) con las cuales se realizó una curva de calibración para luego

mediante la medida de absorbancia a 595nm determinar por interpolación la concentración de las proteínas totales (las curvas de calibración serán mostradas en resultados).

Además para estimar la abundancia relativa de las bandas proteicas obtenidas en los ensayos de SDS-PAGE, se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría utilizando el programa *Gel-Pro Analyzer Version 3.0* (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD, USA).

3.8.4.4- Detección inmunológica: western blot

Las proteínas purificadas se sometieron primero a una electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) y luego a una electrotransferencia utilizando una celda *Bio-Rad Mini-Trans-Blot transfer* siguiendo el protocolo desarrollado por Burnette [24].

Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (HybondTM-ECLTM, Amersham Biosciences, UK) durante 16 h. a 30 V (voltaje constante) en presencia del *buffer* de transferencia: Tris-HCl 20 mM; glicina 150 mM; 20% (V/V) metanol; pH 8,0. Las membranas fueron bloqueadas con BSA 3% (P/V) en PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM) durante 1 h., lavadas 2 veces durante 15 min. con PBS-BSA.

El revelado se llevó a cabo mediante la incubación con anticuerpos primario y secundario. Como la proteína se expresa fusionada a un *tag* de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal fue incubada primero con anticuerpos monoclonales a-His *tag* (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) de conejo, y luego con el anticuerpo secundario a-IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina.

Finalmente, las membranas se lavaron 2 veces con PBS durante 10 min. y fueron incubadas por 5 min. con *buffer* fosfatasa conteniendo: Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.

La presencia de las bandas proteicas se reveló mediante el agregado de los sustratos correspondientes: 66 µl de cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT; Promega-USA) 50 mg/ml y 33 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP; Promega-USA) 50 mg/ml en 15 ml de *buffer* fosfatasa. La reacción se desarrolló al resguardo de la luz hasta la aparición de bandas de color púrpura.

3.8.4.5- Ensayo de unión de la proteína recombinantes a almidón

Para llevar a cabo el ensayo de unión de la proteína al almidón se incubó 60 µl de SdAmy purificada durante 30 min. en hielo, en presencia o ausencia de 3 mg de almidón (*starch from potato*, Sigma-aldrich). Luego mediante centrifugación (30 s. a 5000 rpm a 4°C) se separó sobrenadante y *pellet*. El almidón por ser insoluble se deposita en el fondo del tubo arrastrando la proteína unida. El *pellet* fue resuspendido en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Las muestra fueron analizadas mediante SDS-PAGE y con el programa bioinformático *Gel-Pro Analyzer Version 3.0* (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD, USA). De esta manera, fue posible estudiar la intensidad de cada banda proteica y estimar el porcentaje de proteína que se une al polisacárido.

3.8.5- Ensayos de actividad enzimática

3.8.5.1- Ensayo de actividad enzimática mediante *kit* comercial

La actividad enzimática se determinó utilizando un *kit* comercial (Amilokit, Wiener Lab). Como control positivo se midió la actividad de una enzima α-amilasa comercial Roche de páncreas de cerdo.

Las muestras de proteína se incubaron 7,5 min. a 37°C en presencia del reactivo A que consiste en una solución de almidón 500 mg/l tamponada con *buffer* fosfato 0.1 M a pH 7, NaCl 0,15 M. produciéndose la hidrólisis enzimática.

La reacción se detiene por el agregado del reactivo B (solución 0,01 eq/l de iodo en ácido clorhídrico 0,02 M); que simultáneamente colorea el almidón remanente, no hidrolizado.

La disminución del color respecto al sustrato coloreado (sin proteína) es proporcional a la actividad α-amilasa y se determina mediante medidas de absorbancia a 640nm. La actividad en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl) se calcula como se muestra en la ecuación 1.

$$\frac{UA}{dl} = \frac{(C-D)}{c} \cdot 1000 \quad (1)$$

En los ensayos para la determinación del pH óptimo de la enzima, se preparó el reactivo A utilizando almidón (*starch from potato*, Sigma-Aldrich) 500 mg/l, *buffer* $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M a diferentes pH, y NaCl 0,15 M.

3.8.5.2- Ensayo de actividad en placa

El ensayo de actividad en placa es una alternativa de observar la presencia o ausencia de actividad amilolítica por medio de la aparición de halos/círculos (dependiendo el ensayo) transparentes sobre la placa, debido a la degradación del almidón.

Se prepararon placas conteniendo AcNa 50 mM pH 5,5, almidón 0,5% (P/V) y agar 1,2% (P/V). Se añadieron distintas cantidades de proteína (o distintas concentraciones de cultivos *E.coli* BL21 RIL pET32a/pET32a_SdAmy inducidos) y luego las placas fueron incubadas durante 1 h. a 37°C.

El revelado se llevó a cabo mediante el agregado de una solución de lugol, el cual colorea el almidón remanente permitiendo la observación de halos/círculos transparentes relacionados con la actividad enzimática. Como control positivo se utilizó una enzima α -amilasa comercial Roche de páncreas de cerdo.

3.8.5.3- Efecto del pH y temperatura sobre la actividad α -amilasa

Se estudió el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, permitiendo determinar el pH y la temperatura óptima a la que SdAmy presenta mayor actividad.

Las medidas de actividad enzimática fueron determinadas mediante *kit* comercial.

Perfil de pH

Se incubó la proteína a 37°C durante 7,5 min. en presencia del reactivo A, preparado previamente a diferentes pH: 3; 4; 5; 6; y 7. La reacción se detuvo por el agregado del reactivo B, cómo se especificó en el ítem de ensayo de determinación de actividad enzimática mediante *kit* comercial. Posteriormente se midió absorbancia a 640nm y se determinó la actividad enzimática para cada pH.

Perfil de Temperatura

Se incubó la proteína a diferentes temperaturas (rango 0-70°C) durante 7,5 min. en presencia del reactivo A, preparado previamente a pH 5 (pH óptimo). La reacción se detiene por el agregado del reactivo B, cómo se especificó en el ítem del ensayo de determinación de actividad enzimática mediante *kit* comercial. Posteriormente se midió absorbancia a 640nm y se determinó la actividad enzimática para cada temperatura.

3.8.5.4- Cinética enzimática y determinación de parámetros cinéticos

Se llevó a cabo el estudio de la cinética de la enzima α -amilasa recombinante SdAmy y de una α -amilasa comercial Roche con el fin de poder determinar y comparar sus parámetros cinéticos. Se realizaron mediciones de actividad a diferentes concentraciones de almidón (g/l).

Para el ensayo se prepararon distintas soluciones de reactivo A con las siguientes concentraciones de almidón: 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.25; 0.5; 0.8; 1 y 2 g/l. Posteriormente se realizaron mediciones de actividad y mediante el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc) se graficó la actividad vs concentración de almidón. A partir de las gráfica obtenidas se observó que ambas enzimas ajustan al modelo de Michaelis-Menten a partir del cual fue posible determinar los parámetros cinéticos de la reacción: V_{max} y K_m .

3.8.6- Estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad α -amilasa

3.8.6.1- Inactivación térmica.

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la proteína recombinante SdAmy y la α -amilasa comercial Roche, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de inactivación térmica:

- 1) Las proteínas se incubaron durante 10 minutos a distintas temperaturas (rango 0-75°C) y luego se llevaron a cabo mediciones de actividad enzimática a 37°C mediante *kit* comercial Amilokit utilizando el reactivo A a pH 5.

- 2) Las proteínas se incubaron a diferentes temperaturas: 48; 50; 55; 60 y 65°C durante 0, 1, 2, 5, y 10 minutos, y luego se llevaron a cabo mediciones de actividad enzimática a 37°C mediante *kit* comercial Amilokit utilizando el reactivo A a pH 5.

3.8.6.2- Efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad y la estabilidad térmica a 50°C de SdAmy y α -amilasa comercial Roche.

Se estudió el efecto de acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad enzimática y la estabilidad térmica a 50°C de SdAmy y de la α -amilasa comercial de Roche.

	Concentración final (mM)
CaCl ₂	1,0 y 5,0
Acarbosa	0,1 y 1,0
Maltosa	0,1 y 1,0

Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática

Mediante *kit* comercial y utilizando reactivo A a pH 5 se llevaron a cabo mediciones de actividad a 37°C de ambas proteínas en presencia y ausencia de los distintos compuestos.

Efecto de los compuestos sobre la estabilidad térmica a 50°C

Las proteínas fueron incubadas en presencia y ausencia de los distintos compuestos a 50°C durante 0, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos, y luego se llevaron a cabo mediciones de actividad enzimática a 37°C mediante *kit* comercial y utilizando reactivo A a pH 5.

3.9- Métodos Bioinformáticos

3.9.1- Análisis de dominios conservados

La búsqueda dominios conservados se realizó mediante NCBI (National Center for Biotechnology; www.ncbi.nlm.nih.gov). Se identificaron los tres dominios presentes en la α -amilasa de *S. degradans* (Dominio catalítico, DC; dominio C conservado, Amy_C; dominio de unión a carbohidratos perteneciente a la familia 20, CBM20), mediante la similitud con dominios de proteínas ya establecidos en otros

organismos. Además a partir de estos fue posible identificar los sitios activos, sitios catalíticos, sitios de unión a calcio y sitios de unión a almidón junto con los residuos aminoácidos involucrados para cada uno.

3.9.2- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Se analizó la similitud de secuencia de la α -amilasa de *S. degradans* con secuencias de proteínas de diferentes organismos mediante *Clustal Omega* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), y las alineaciones de secuencias se visualizaron usando *Bio Edit* [25].

El análisis filogenético molecular se llevó a cabo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT [26] y la construcción del árbol filogenético se realizó utilizando MEGA5 [27]. El porcentaje de taxones asociados se calculó a partir de 500 construcciones de árboles filogenéticos como se describió anteriormente [28]. El análisis involucró 100 secuencias de aminoácidos.

3.9.3- Modelado Molecular

El modelado molecular por homología de la α -amilasa de *S. degradans* se llevó a cabo mediante los siguientes programas bioinformáticos:

- ✓ Tito (www.atome.cbs.cnrs.fr/AT23/index.html)

@TOME (automatic Threading Optimization Modeling and Evaluation), es una web basada en análisis comparativos, dedicada al modelado de estructuras de proteínas y al acoplamiento de pequeños ligandos. Permite la construcción de modelos 3D, el reconocimiento de pliegues, la selección de los templados, la edición de las alineaciones estructurales, y además realizar comparaciones de las estructuras.

Este programa puede usarse para modelar una molécula específica o también usarse para estudios de proteínas como familia de proteínas o genomas [29].

- ✓ I-Tasser (www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)

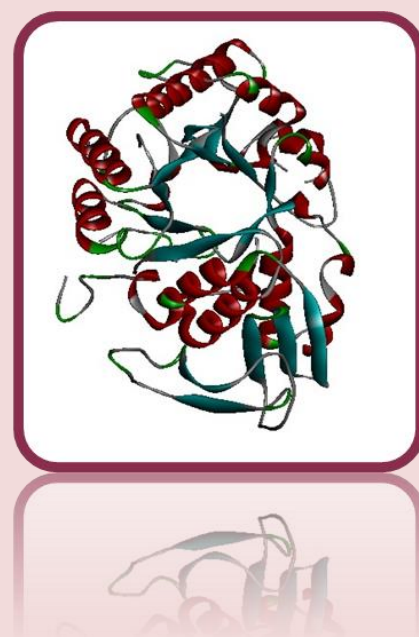
I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement) proporciona predicciones precisas estructurales y funcionales utilizando algoritmos de última generación. Primero identifica los templados estructurales en el PDB (*Protein data Bank*) mediante múltiples enfoques de aproximación LOMETS. Las funciones predichas

sobre el target derivan de modelos 3D a través de la base de datos de proteínas BioLiP [30-32].

La validación de los modelos moleculares obtenidos se realizó mediante el programa Verify 3D [33]; http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/. Este servidor evalúa las estructuras de proteínas usando perfiles tridimensionales. Analiza la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). A cada residuo se le asigna una clase estructural en función de su ubicación y entorno (alfa, beta, bucle, polar, apolar, etc.). Luego, se utiliza una base de datos generada a partir de estructuras buenas para obtener un puntaje para cada uno de los 20 aminoácidos en esta clase estructural. El eje vertical en la gráfica representa el *score* promedio del perfil 3D-1D para cada residuo. Los puntajes varían de -1 (mala puntuación) a +1 (buena puntuación).

La alineación de estructuras proteicas 3D fue realizada mediante el servidor web *SuperPose Version 1.0* [34], <http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/>. SuperPose es un servidor de superposición de proteínas. A partir de una superposición de dos o más estructuras, genera alineaciones de secuencia, alineaciones de estructura, coordenadas de PDB, estadísticas de RMSD, gráficos de distancia e imágenes interactivas de las estructuras superpuestas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4- Resultados y discusión

4.1- Estudios bioinformáticos sobre la estructura de la SdAmy

4.1.1- Dominios conservados

La búsqueda de dominios conservados mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), permitió identificar tres dominios presentes en la α -amilasa de *S. degradans* (Dominio catalítico, DC, en la región N-terminal de SdAmy; dominio C conservado, Amy_C, en la región central de la proteína y módulo de unión a carbohidratos perteneciente a la familia 20, CBM20, en el extremo C-terminal), mediante la comparación con la secuencia aminoacídica y los dominios informados de otras amilasas conocidas (figura 6).

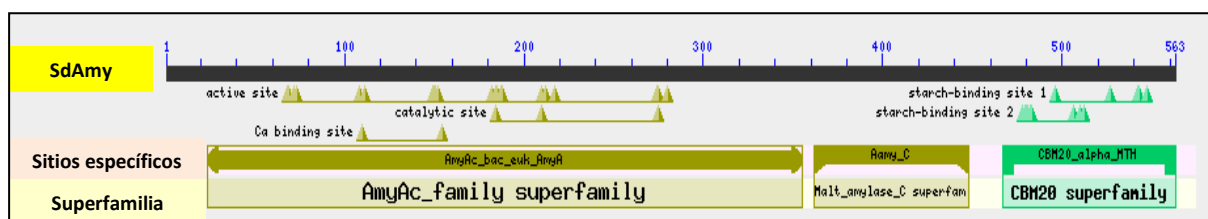


Figura 6. Esquema de la estructura de la proteína SdAmy, mostrando los dominios DC, Amy_C y CBM20. La búsqueda se realizó utilizando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En la figura 7 se muestra un esquema representativo de la ubicación de los tres dominios identificados en la α -amilasa de *S. degradans* junto con el número de acceso en el NCBI y otros datos específicos de la misma.

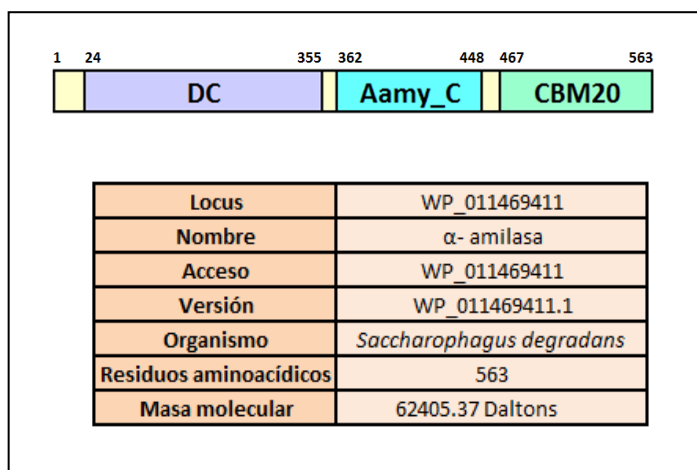


Figura 7. Esquema de la estructura de la proteína α -amilasa de *S. degradans*. Los números en la parte superior indican la posición de los aminoácidos que determinan el comienzo y finalización de cada una de las regiones descritas. La tabla inferior muestra el número de acceso y otros datos específicos de la proteína.

Este análisis además brindó algunas características acerca de la proteína y la localización de los respectivos dominios proteicos, indicando la ubicación del sitio activo, sitio de unión a calcio y los dos sitios propuestos de unión a almidón, junto con los diferentes residuos aminoacídicos involucrados en cada uno. A continuación se detallan las características obtenidas mediante la búsqueda por NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>):

Características de la proteína

De acuerdo a la base de datos CAZY (Carbohydrate-Active enzymes database, <http://www.cazy.org/>), las α -amilasas se encuentran en diferentes familias de glucósidos hidrolasas (GH), como la GH13, GH57, GH119 y GH126 [35]. Dentro de las diferentes familias podemos encontrar α -amilasas de diferentes organismos como bacterias, hongos, mamíferos, insectos, moluscos y nematodos. En general, las α -amilasas presentan 3 dominios: **A**, **B**, **C**. **A** es un (α/β) -8-barril; **B** es un bucle entre las cadenas 3- β y la hélice 3- α de A; **C** es la extensión C-terminal caracterizada por una *Greek key* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Características de los dominios

- **Dominio catalítico (DC)**

Este dominio se encuentra en todas las α -amilasas bacterianas y eucarióticas. Cataliza la hidrólisis de enlaces α -(1,4) glucosídicos de glucógeno, almidón, polisacáridos relacionados y algunos oligosacáridos.

Dentro del DC se encuentra el sitio activo además del sitio de unión a calcio (figura 6).

Hay una hendidura encontrada en el sitio activo donde se encuentran tres de los residuos involucrados en la catálisis, un residuo de aspartato (D), un glutamato (E) y otro aspartato (D). Esta triada DED está altamente conservada en la familia de las α -amilasas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A partir del análisis bioinformático realizado, se pudo inferir que los residuos aminoacídicos más importantes que le otorgan la funcionalidad a cada uno de los sitios presentes en el DC son los siguientes:

Sitio activo: W68-W69-Y72-Q73-V108-H111-L149-V150-G151-L152-E210-I212-E217-H274-D275-D280.

Sitio catalítico: D184-E210-D275.

Sitio de unión a calcio: N110-D154.

En la figura 8 se muestran los alineamientos obtenidos del DC junto con los residuos aminoacídicos conservados en las secuencias alineadas.



Figura 8. Alineamiento de secuencias proteicas correspondientes al DC. En amarillo se indican los residuos aminoacídicos conservados de las secuencias alineadas; y con círculo y flecha negra los residuos D184, E210, D275 involucrados en la catálisis. Query es la secuencia correspondiente al DC de la α -amilasa de *S. degradans*.

- **Módulo de unión a carbohidratos (CBM20)**

El módulo de unión a carbohidratos de la familia 20 (CBM20), también conocido como dominio de unión al almidón, se encuentra en un gran número de enzimas que degradan el almidón incluyendo α -amilasas, glucoamilasas y CGTasas (ciclodextrina glucanotransferasas).

El CBM20 se pliega como una estructura de barril- β antiparalela con dos sitios de unión al almidón. Estos dos sitios difieren entre sí, el sitio de unión 1, es pequeño, actúa como sitio inicial de reconocimiento de almidón y presenta cambios estructurales mínimos tras la unión del mismo.

El sitio de unión 2 es más grande que sitio de unión 1 y está involucrado en el reconocimiento específico de las regiones apropiadas del almidón. Tras la unión del ligando sufre cambios estructurales significativos. Una porción del sitio 2 comprende un bucle flexible que permite al dominio de unión unirse en una gran variedad de orientaciones a las hebras del almidón (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los residuos aminoacídicos encontrados en cada uno de los sitios y que participarían en la unión al polisacárido son:

Sitio de unión a almidón 1: W496-K527-W542-Q543-N547.

Sitio de unión a almidón 2: T478-Y479-W480-G481-Q482-S483-A506-P510-W512.

En la figura 9 se muestran los alineamientos de las secuencias aminoacídicas del CBM20 de SdAmy con los residuos aminoacídicos de otros CBM20.

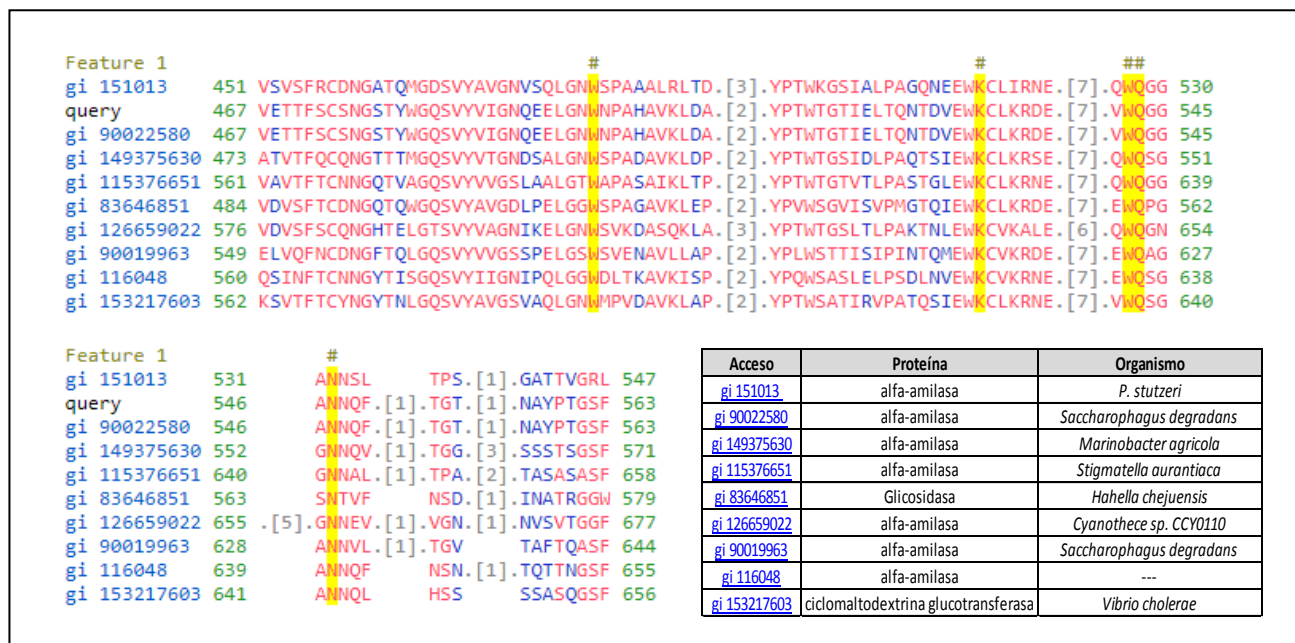


Figura 9. Alineamientos de secuencias proteicas correspondientes al CBM20. En amarillo se indican los residuos conservados de las secuencias alineadas. Query es la secuencia correspondiente al CBM20 de la α -amilasa de *S. degradans*.

• Dominio C conservado (Amy_C)

Este dominio hasta el momento no ha sido identificado. Mediante el análisis comparativo de diferentes dominios conservados se observó que el dominio Amy_C de SdAmy tiene una alta similitud con el dominio C-terminal de la amilasa maltogénica, una enzima que hidroliza material de almidón. Las amilasas maltogénicas son centrales para el metabolismo de los carbohidratos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A modo de resumen en la figura 10, se muestra la secuencia proteica completa de SdAmy indicando sus dominios DC; Amy_C; CBM20 y sus residuos más importantes que participan en la catálisis, en la unión a calcio y unión a almidón. Y en la tablas I y II se detallan los residuos aminoacídicos relevantes del CBM20 y DC.

MRKLTQLFIFAAALFSICSHAQPRRTAFVHLFEWQWNDIASECENVLGPKGAAVQVSPPPQKS
VSSSQWWSRYQPVSYAIEGRSGNRNEFASMSRCKNAGVDIYVDAVINHMAAGGRYYPEV
PYYAEHFHTCYGQIDYGNRWQVQNCDLVGLNDLATEQDYVRTKIANYLNDLTNLGVAGFRF
DAAKHIPVGDIKAKLIGNPYIFQEVIGAPGEPIQPSEYTYLADVTEFNFTKSVSHFFKGRGP
IKELKNIGTWGGWVASADAVTFVANHDNQRQDTNNTITHKDGDNRTMAHVFMGLWPYGY
PKVMSSYEWYDHDQGPPAHGASSCNSGWLCEHRTPAIANMVAFRNFTADEFRVTNYWDN
GNNQIAWGRGGKGFVINMEGNNLTRTFQTGMPAGRYCDIISGNYNASNKSCSGNIIDVDNN
GNAVITAYYRNGAAIHVGAIVEDCDGTDCCNTCPTEKVETTFSCSNGSTYWGQSVYVIGNQE
ELGNWNPAAVAVKLDASAYPTWTGTIELTQNTDVEWKCLKRDEQTPSNGVWVWQGGANNQF
NTGTTNAYPTGSF-563

Figura 10. Secuencia aminoacídica de la α -amilasa de *S. degradans*. En color fucsia se indica el dominio catalítico DC, en celeste el dominio Amy_C y en verde el CBM20. Los aminoácidos resaltados en amarillo corresponden a los residuos relevantes en cada uno de los dominios.

Dominio DC			
Residuo	Nombre	Posición	Sitio
W68	Triptófano	68	Sitio activo
W69	Triptófano	69	Sitio activo
Y72	Tirosina	72	Sitio activo
Q73	Glutamina	73	Sitio activo
V108	Valina	108	Sitio activo
H111	Histidina	111	Sitio activo
L149	Leucina	149	Sitio activo
V150	Valina	150	Sitio activo
G151	Glicina	151	Sitio activo
L152	Leucina	152	Sitio activo
E210	Glutamato	210	Sitio activo - Sitio catalítico
I212	Isoleucina	212	Sitio activo
E217	Glutamato	217	Sitio activo
H274	Histidina	274	Sitio activo
D275	Aspartato	275	Sitio activo - Sitio catalítico
D280	Aspartato	280	Sitio activo
D184	Aspartato	184	Sitio catalítico
N110	Asparagina	110	Sitio de unión a calcio
D154	Aspartato	154	Sitio de unión a calcio

Tabla I. Residuos aminoacídicos del DC involucrados en la catálisis y en la unión a calcio en la proteína α -amilasa de *S. degradans*.

Dominio CBM20			
Residuo	Nombre	Posición	Sitio
W496	Triptófano	496	Sitio de unión a almidón 1
K527	Lisina	527	Sitio de unión a almidón 1
W542	Triptófano	542	Sitio de unión a almidón 1
Q543	Glutamina	543	Sitio de unión a almidón 1
N547	Asparagina	547	Sitio de unión a almidón 1
T478	Treonina	478	Sitio de unión a almidón 2
Y479	Tirosina	479	Sitio de unión a almidón 2
W480	Triptófano	480	Sitio de unión a almidón 2
G481	Glicina	481	Sitio de unión a almidón 2
Q482	Glutamina	482	Sitio de unión a almidón 2
S483	Serina	483	Sitio de unión a almidón 2
A506	Alanina	506	Sitio de unión a almidón 2
P510	Prolina	510	Sitio de unión a almidón 2
W512	Triptófano	512	Sitio de unión a almidón 2

Tabla II. Residuos aminoacídicos del dominio CBM20 involucrados en la unión a almidón en la proteína α -amilasa de *S. degradans*.

4.1.2- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

En primer lugar se analizó la similitud de secuencia proteica de la α -amilasa de *S. degradans* con secuencias de proteínas de diferentes organismos mediante *Clustal Omega* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.

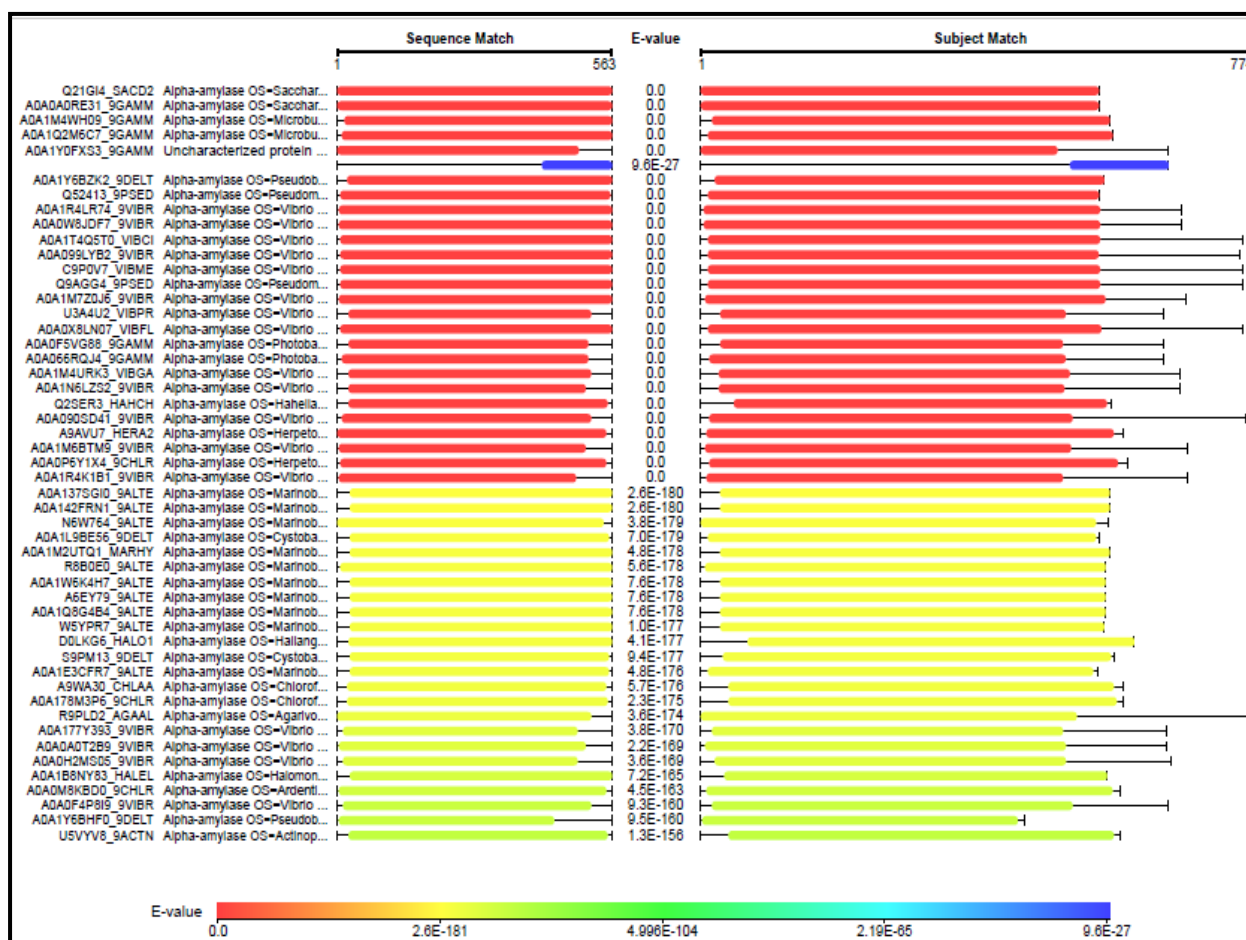


Figura 11. Alineamiento de las secuencias de proteínas de la familia de α -amilasa de *S. degradans* obtenido por PSI-Blast realizado con *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Posteriormente se llevó a cabo el análisis filogenético molecular utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT [26] y la construcción del árbol filogenético se realizó utilizando MEGA5 [27]. El análisis involucró 100 secuencias de aminoácidos.

En la figura 12 se muestra el árbol filogenético obtenido, y en la tabla III se detallan las proteínas y los organismos con sus correspondientes números de acceso, para que puedan ser identificados en el árbol.

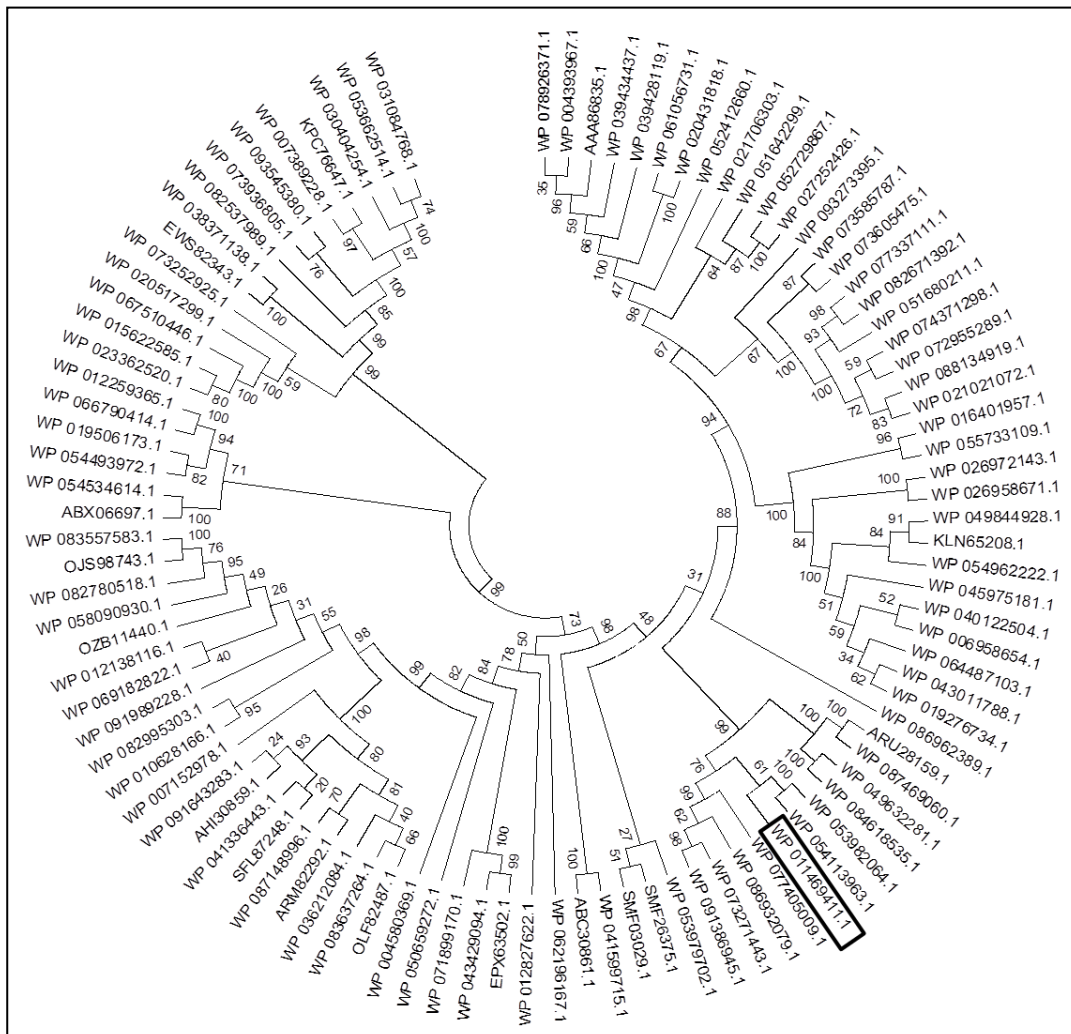


Figura 12. Árbol filogenético. El análisis filogenético molecular se llevó a cabo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT [26] y la construcción del árbol filogenético se realizó utilizando MEGA5 [27]. El porcentaje de taxones asociados se calculó a partir de 500 construcciones de árboles filogenéticos como se describió anteriormente [28]. El análisis involucró 100 secuencias de aminoácidos.

El número de acceso recuadrado corresponde a la proteína α -amilasa de *S. degradans*.

Número de acceso	Proteína	Organismo	Número de aminoácidos	% Identidad
WP_011469411.1	ATPasa	<i>Saccharophagus degradans</i>	563	100%
WP_053982064.1	ATPasa	<i>Marinagarivorans algicola</i>	572	67%
WP_054113963.1	ATPasa	<i>Marinagarivorans algicola</i>	572	67%
WP_073271443.1	ATPasa	<i>Microbulbifer donghaiensis</i>	577	66%
WP_091386945.1	ATPasa	<i>Microbulbifer marinus</i>	574	66%
WP_077405009.1	ATPasa	<i>Microbulbifer agarilyticus</i>	582	64%
WP_086932079.1	ATPasa	<i>Cellvibrionaceae bacterium 017</i>	580	65%
ARU28159.1	proteína hipotética CBR65_12395	<i>Cellvibrio sp. PSBB006</i>	661	63%
WP_087469060.1	proteína hipotética	<i>Cellvibrio sp. PSBB006</i>	645	64%
WP_049632281.1	proteína hipotética	<i>Cellvibrio sp. pealriver</i>	667	70%
WP_084618535.1	proteína hipotética	<i>Cellvibrio sp. OA-2007</i>	669	64%
SMF26375.1	alfa-amilasa	<i>Pseudobacteriovorax antillalogorgicola</i>	570	54%
WP_077337111.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio ruber</i>	679	54%
WP_082671392.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio sp. MEBIC08052</i>	679	54%
WP_039434437.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio navarrensis</i>	762	54%
WP_073585787.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio quintilis</i>	686	51%
WP_078926371.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	765	53%
WP_052729867.1	alfa-amilasa	<i>Photobacterium halotolerans</i>	654	59%
WP_021706303.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio proteolyticus</i>	653	60%
WP_027252426.1	alfa-amilasa	<i>Photobacterium halotolerans</i>	654	56%
WP_004393967.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio metschnikovii</i>	765	53%
WP_039428119.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio navarrensis</i>	762	53%
AAA86835.1	alfa-amilasa	<i>Pseudomonas sp. KFCC10818</i>	563	53%
WP_088134919.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio gazogenes</i>	678	53%
WP_051642299.1	alfa-amilasa	<i>Photobacterium galathea</i>	654	58%
WP_061056731.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio fluvialis</i>	766	53%
WP_093273395.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio xiamenensis</i>	765	57%
WP_072955289.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio gazogenes</i>	677	55%
WP_021021072.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio gazogenes</i>	678	53%
WP_074371298.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio spartinae</i>	677	54%
WP_052412660.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio maritimus</i>	770	59%
WP_051680211.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio rhizosphaerae</i>	679	59%
WP_041599715.1	proteína hipotética	<i>Hahella chejuensis</i>	565	49%
ABC30861.1	Glicosidasa	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	579	51%
WP_020431818.1	1, 4-alpha-D-glucan glucanohydrolase	<i>Vibrio fluvialis</i>	768	60%
WP_073605475.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio aerogenes</i>	688	53%
ABX06697.1	alfa-amilasa	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> DSM 785	596	51%
WP_086962389.1	Multispecies: alfa-amilasa	<i>Vibrio</i>	688	56%
WP_054534614.1	ATPasa	<i>Herpetosiphon geysericola</i>	602	50%
WP_071899170.1	alfa-amilasa	<i>Cystobacter ferrugineus</i>	562	49%
WP_082780518.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter excellens</i>	578	50%
EPX63502.1	alfa-amilasa	<i>Cystobacter fuscus</i> DSM 2262	584	48%
WP_053979702.1	proteína hipotética	<i>Marinagarivorans algicola</i>	553	54%
WP_043429094.1	alfa-amilasa	<i>Cystobacter fuscus</i>	562	49%
WP_004580369.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter nanhaiticus</i>	575	51%
WP_012138116.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	572	49%
WP_012827622.1	alfa-amilasa	<i>Haliangium ochraceum</i>	612	51%
AHI30859.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter salarius</i>	570	51%
SFL87248.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter sp. DSM 26291</i>	571	51%

WP_036212084.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. MCTG268	553	52%
ARM82292.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter salarius</i>	571	52%
WP_091643283.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. DSM 26291	551	51%
WP_087148996.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter salarius</i>	551	52%
OLF82487.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. C18	571	52%
WP_083637264.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. C18	553	52%
WP_016401957.1	alfa-amilasa	<i>Agarivorans albus</i>	774	56%
WP_041336443.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter salarius</i>	553	51%
WP_066790414.1	ATPasa	<i>Chloroflexus islandicus</i>	597	50%
WP_012259365.1	Multispecies: alfa-amilasa	<i>Chloroflexus</i>	597	51%
QJS98743.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	578	49%
WP_091989228.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter gudaonensis</i>	571	51%
WP_007152978.1	ATPasa	<i>Marinobacter algicola</i>	571	52%
WP_083557583.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	560	50%
WP_050659272.1	alfa-amilasa	<i>Gallaecimonas pentaromativorans</i>	579	49%
WP_069182822.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter adhaerens</i>	560	50%
WP_058090930.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. LQ44	578	50%
WP_054962222.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio bivalvicida</i>	659	52%
WP_049844928.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio</i> sp. VPAP30	659	52%
KLN65208.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio</i> sp. VPAP30	664	52%
WP_043011788.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	659	51%
WP_019276734.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	659	51%
WP_064487103.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	659	51%
WP_026972143.1	alfa-amilasa	<i>Aliagarivorans marinus</i>	775	57%
WP_040122504.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	659	50%
WP_006958654.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	659	51%
WP_010628166.1	ATPasa	<i>Halomonas</i> sp. KM-1	587	47%
WP_026958671.1	alfa-amilasa	<i>Aliagarivorans taiwanensis</i>	784	57%
WP_055733109.1	alfa-amilasa	<i>Agarivorans gilvus</i>	779	49%
WP_082995303.1	alfa-amilasa	<i>Halomonas elongata</i>	573	47%
SMF03029.1	alfa-amilasa	<i>Pseudobacteriovorax antillogorgiicola</i>	458	56%
WP_054493972.1	ATPasa	<i>Ardenticatena maritima</i>	594	49%
WP_045975181.1	alfa-amilasa	<i>Vibrio neptunius</i>	661	49%
WP_020517299.1	proteína hipotética	<i>Actinoplanes globisporus</i>	588	47%
QZB11440.1	alfa-amilasa	<i>Marinobacter</i> sp. 34-60-7	538	48%
WP_023362520.1	alfa-amilasa	<i>Actinoplanes friuliensis</i>	594	47%
WP_019506173.1	proteína hipotética	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319	499	52%
WP_067510446.1	alfa-amilasa	<i>Actinoplanes</i> sp. TFC3	602	46%
WP_073936805.1	Glicosidasa	<i>Streptomyces</i> sp. CB02400	574	47%
WP_007389228.1	Glicosidasa	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	574	45%
WP_093545380.1	Glicosidasa	<i>Streptomyces</i> sp. di50b	573	46%
KPC76647.1	Glicosidasa	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL WC-3753	574	45%
WP_053662514.1	Glicosidasa	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-7442	574	46%
WP_030404254.1	Multispecies: glicosidasa	<i>Streptomyces</i>	574	46%
WP_031084768.1	Multispecies: glicosidasa	<i>Streptomyces</i>	574	46%
EWS82343.1	glicosidasa	<i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	583	45%
WP_062196167.1	ATPasa	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	626	44%
WP_073252925.1	proteína hipotética	<i>Cryptosporangium aurantiacum</i>	597	43%
WP_082537989.1	Glicosidasa	<i>Angustibacter</i> sp. Root456	564	46%
WP_038371138.1	Glicosidasa	<i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	594	45%
WP_015622585.1	alfa-amilasa	<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109	611	44%

Tabla III. Nombres de organismos y proteínas correspondientes a los diferentes números de accesos mostrados en el árbol filogenético.

En la siguiente figura se muestran las 10 proteínas más cercanas en el árbol, a la α -amilasa *S. degradans*.



Figura 13. Porción del árbol filogenético correspondiente a las diez proteínas más cercanas a la α -amilasa de *S. degradans*.

El alineamiento de secuencias proteicas mostrado anteriormente permitió comparar la secuencia proteica de la α -amilasa de *S. degradans* con secuencias de proteínas de diferentes organismos y construir un árbol filogenético para analizar las relaciones evolutivas entre las mismas.

En el árbol filogenético se encontraron 10 proteínas cercanas a la α -amilasa de *S. degradans*, todas pertenecientes a bacterias marinas, algunas habitantes en algas y otras encontradas en sedimentos marinos.

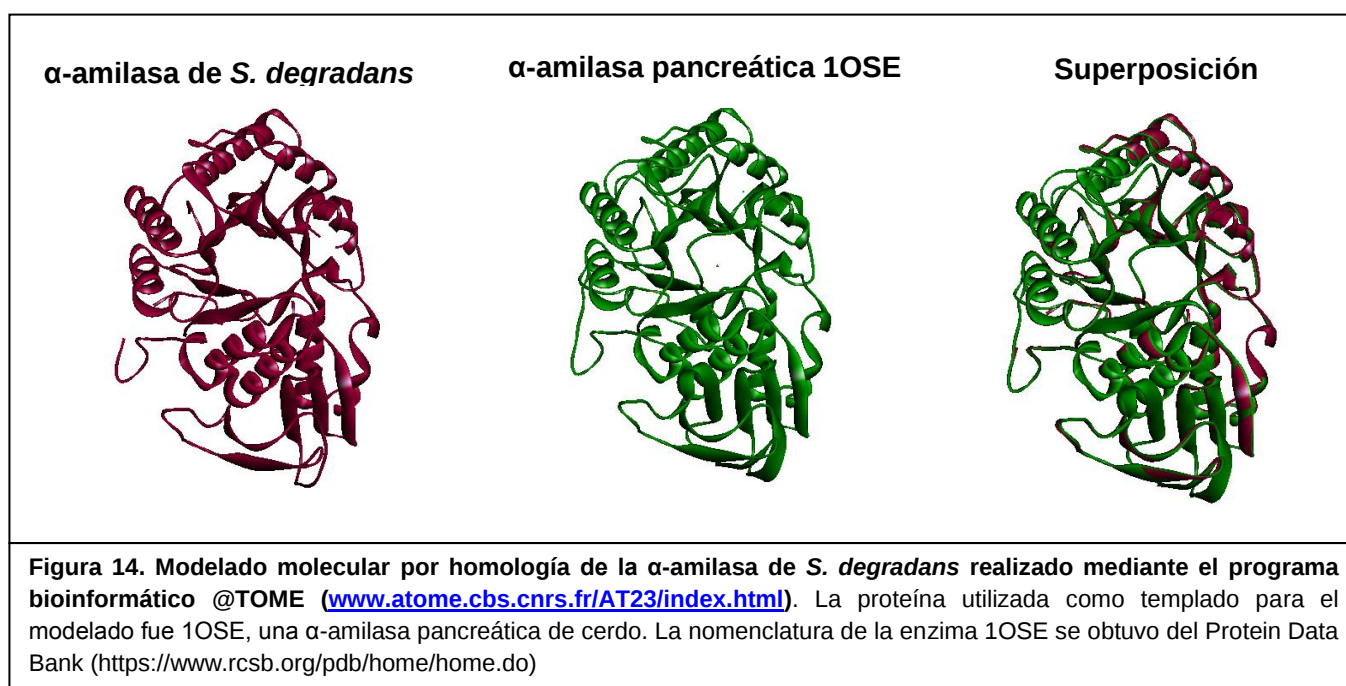
4.1.3- Modelado molecular de la estructura 3D de la SdAmy

El modelado molecular por homología de la α -amilasa de *S. degradans* se llevó a cabo por dos programas bioinformáticos: TITAN, @TOME (automatic Threading Optimization Modeling and Evaluation, www.atome.cbs.cnrs.fr/AT23/index.html) y I-Tasser; (Iterative Threading Assembly Refinement; www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Este último además brindó información acerca de la interacción de posibles ligandos a la proteína.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis:

- Modelos moleculares propuestos por @TOME:

Para el modelado de la α -amilasa de *S. degradans* se utilizó como templado la proteína 1OSE una α -amilasa pancreática de cerdo. A continuación se muestra el modelo obtenido y la superposición de ambas estructuras proteicas.



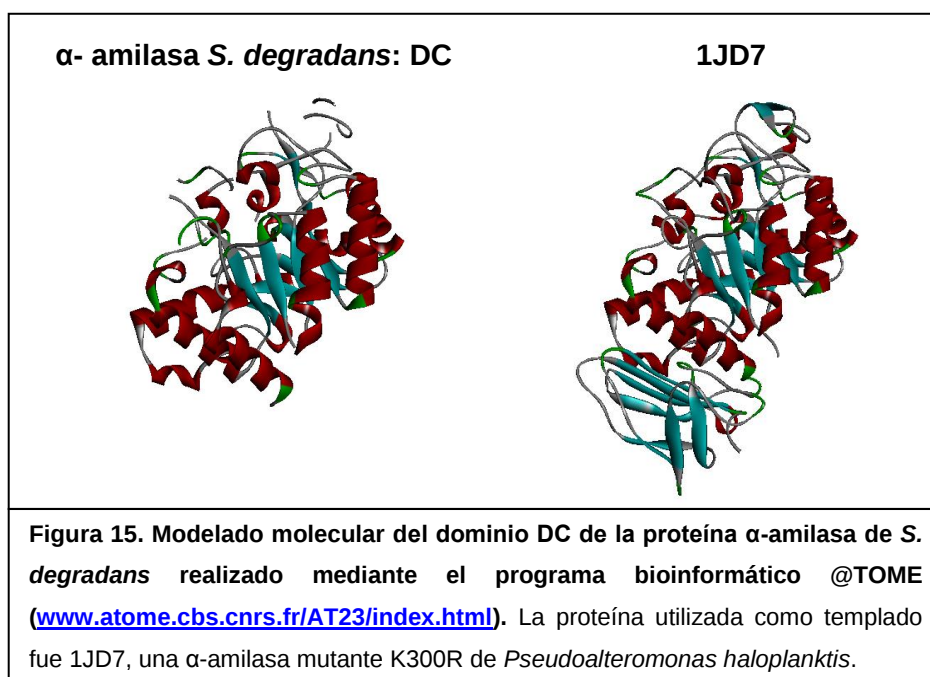
El modelo obtenido fue validado mediante el programa Verify 3D [33], http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/. Éste mostró un 94.07% de los valores de score positivos, y el 80% de estos superiores a 0,2 (score entre 0.08-0.75). De acuerdo con estos resultados se observó que el modelo molecular obtenido de SdAmy fue bueno ya que su score fue superior a 0.

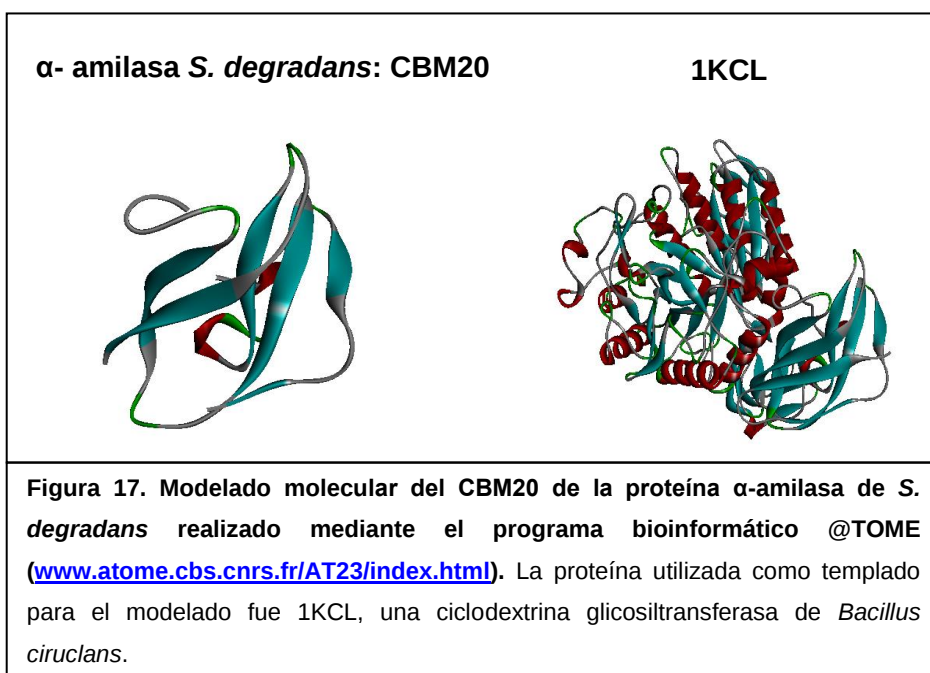
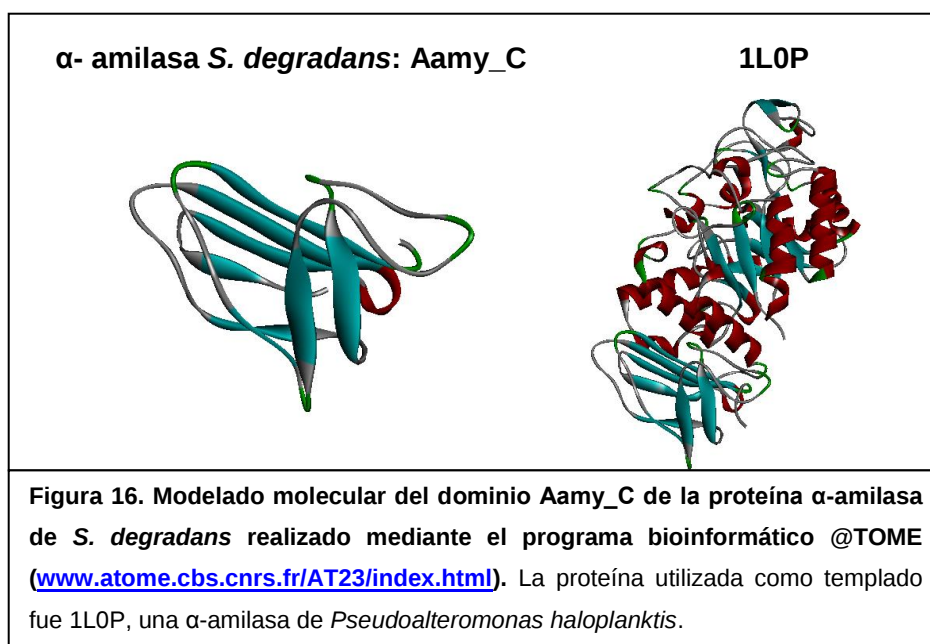
El modelo obtenido de la α -amilasa de *S. degradans* mostró una estructura global similar a la de la α -amilasa pancreática 1OSE con estructuras secundarias α -hélice y de lámina- β conservadas. La superposición de las estructuras 3D de ambas proteínas realizada mediante el servidor web *SuperPose Version 1.0* [34], <http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/> mostró un alto grado de similitud. La superposición de las estructuras 3D de se realizó usando el modelo 3D de SdAmy

obtenido utilizando los residuos aminoacídicos 24-432, mientras que para la α -amilasa pancreática 1OSE los residuos aminoacídicos que se utilizaron fueron 1-496.

También se llevó a cabo el modelado molecular de los tres dominios presentes en la proteína, DC, Amy_C y CBM20 por separado.

El modelado del DC se obtuvo utilizando como templado la proteína 1JD7, una α -amilasa mutante K300R de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Figura 15), mientras que para el modelado del Amy_C se utilizó como templado la proteína 1L0P, una α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Figura 16). Finalmente, para el modelado del dominio CBM20 se utilizó como templado la proteína 1KCL, una ciclodextrina glicosiltransferasa de *Bacillus ciruclans* (Figura 17).





Los tres modelos moleculares presentados anteriormente también fueron analizados mediante el programa Verify 3D [33]; http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/. El modelo del DC mostró el 96.66% de los valores de *score* positivos, y el 80% de los mismos fueron superiores a 0,2 (*score* entre 0.08-0.71).

Los modelos del CBM20 y Amy_C mostraron el 100% de los valores de score positivos, y el 80% de los mismos fueron superiores a 0,2; con un score entre 0.29-0.6 para el modelo del CBM20 y un score entre 0.32-0.57 para el modelo Amy_C. De acuerdo con estos resultados, observamos que todos los modelos obtenidos fueron buenos ya que presentaron scores superiores a 0.

- Sitios de unión a ligandos

El programa I-Tasser permite proponer posibles sitios de unión a ligandos específicos. En la siguiente tabla se muestran algunos ligandos de las α -amilasas y los residuos posiblemente involucrados en la unión a los mismos en SdAmy (Tabla IV).

Ligandos	Residuos del sitio de unión al ligando
Calcio	N110; Q145; D154; H188
Glucosa	W68; Y72; H111; L149; L152; R182; D184; E210; H274; D275
Acarbosa	W68; Y72; H111; Y138; R182; D184; A185; K187; H188; E210; I212; A214; P215; E217; H274; D275
Maltotriosa	W68; Y72; Q73; H111; A114; V150; L152; R182; D184; E210; H274; D275
Maltosa	N2; Y3; W4; D5; R32; T33; W30; K61; W76; N81

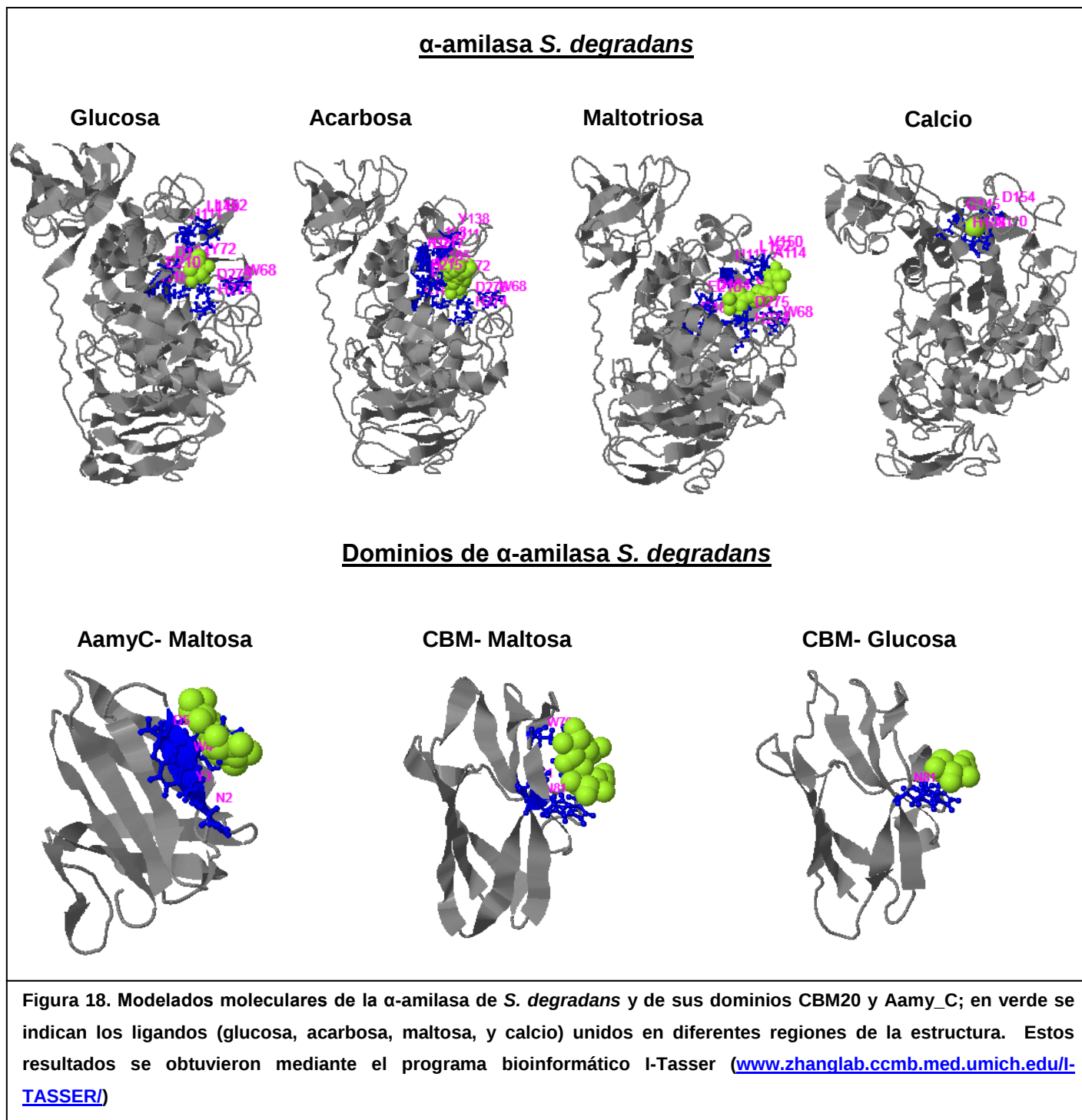
Tabla IV. Ligandos y residuos aminoacídicos en SdAmy posiblemente involucrados en la unión a los mismos.

El calcio, la glucosa, acarbosa, maltotriosa, y maltosa, fueron los posibles ligandos propuestos por el programa.

Este tipo de proteínas presentan sitios de unión a calcio debido a que la mayoría de las α -amilasas son Ca^{2+} -dependientes [36]. La acarbosa es un inhibidor de las glucósidos hidrolasas [37], mientras que la glucosa, maltotriosa y maltosa, son productos de la reacción catalizada por dicha enzima.

Posteriormente, en este trabajo se mostrarán los resultados obtenidos sobre el efecto del calcio, acarbosa y maltosa sobre la proteína α -amilasa recombinante SdAmy.

En la figura 18 se muestran los modelos moleculares obtenidos por I-Tasser junto con ligandos unidos a diferentes regiones de la estructura obtenida de SdAmy.



A modo de resumen, los análisis bioinformáticos presentados anteriormente permitieron identificar los tres dominios presentes en la proteína α -amilasa de *S. degradans* junto con los residuos aminoacídicos relevantes de cada una de las regiones y sus posibles funciones. Además a través de la construcción del árbol filogenético fue posible seleccionar las diez proteínas más cercanas evolutivamente a la proteína en estudio, todas ellas provenientes de bacterias marinas relacionadas con *S. degradans*.

Finalmente mediante los programas bioinformáticos de modelado por homología, hemos podido obtener un modelo molecular de la estructura 3D de la proteína completa y de sus dominios por separado. Además fue posible determinar los posibles sitios de unión de diferentes ligandos comunes para α -amilasas. Dichos ligandos podrían unirse a regiones específicas, como por ejemplo la maltosa o glucosa al dominio Amy_C. A pesar que se desconoce la funcionalidad de este dominio, mediante la información obtenida por I-Tasser, se observó que podría estar relacionado con la unión de estos ligandos (maltosa o glucosa), sugiriendo que dicho dominio podría tratarse de un posible CBM. Sin embargo, los resultados bioinformáticos mostrados en este trabajo son preliminares, ya que a partir de esto se deberá continuar con el estudio de cada uno de los dominios y llevar a cabo la caracterización bioquímica de los mismos.

4.2- Caracterización bioquímica y cinética de la proteína SdAmy

4.2.1- Elución del vector y transformación de células competentes *E. coli* XL1-Blue

En primer lugar se llevó a cabo la elución del vector pET32a_SdAmy (sintetizado por la compañía Genscript, USA) con *buffer* TE y la transformación de células competentes *E. coli* XL1-Blue con dicho vector, obteniendo en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina y tetraciclina, colonias positivas de transformación resistentes a ambos antibióticos (datos no mostrados).

4.2.2- Obtención del vector pET32a_SdAmy a escala pequeña a partir de las células *E. coli* XL1-Blue transformadas

A partir de las células *E. coli* XL1-Blue transformadas se llevó a cabo el aislamiento del ADN plasmídico mediante el uso del *kit* comercial “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich)/lisis alcalina. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (P/V) para resolver las muestras de ADN plasmídico correspondiente al vector pET32a_SdAmy (7640 pb) (figura 19-A). Posteriormente se evaluó la presencia del gen *SdAmy* mediante ensayo de PCR (figura 19-B). La obtención de una banda de ADN de alrededor de 7000 pb en el gel que se muestra en la figura 19-A y la amplificación de un fragmento de ADN de alrededor de 1800 pb. en la figura 19-B sugiere que efectivamente el plásmido aislado de la cepa de *E. coli* es el pET32a que contiene el gen de SdAmy (pET32a_SdAmy).

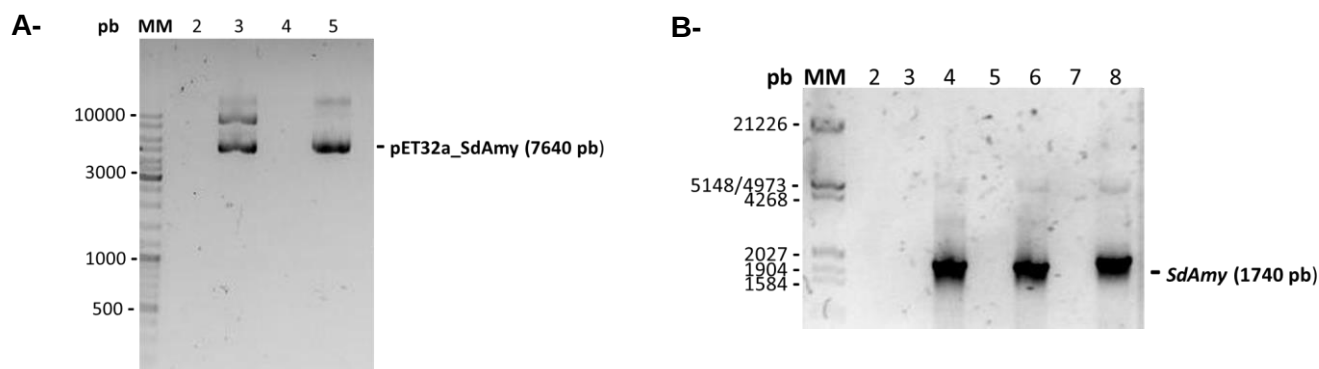


Figura 19. A- Electroforesis en gel de agarosa 0,8% (P/V) de muestras de ADN plasmídico (vectores pET32a_SdAmy; 7640 pb). Calle 1: MM, marcador de tamaño molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix (*Productos Bio-Logicos*). Calle2: --. Calle 3: pET32a_SdAmy#1. Calle 4: --. Calle 5: pET32a_SdAmy #2. **B- Electroforesis en gel de agarosa 0,8% (P/V) de productos de PCR *SdAmy* (1740 pb) de pET32a_SdAmy.** Calle 1: MM, marcador de tamaño molecular (λ EcoRI/HindIII-*Productos Bio-Logicos*). Calle 2: ---. Calle 3: blanco de PCR (sin vector pET32a_SdAmy). Calle 4: control positivo, pET32a_SdAmy. Calle 5: ---. Calle 6: mp pET32a_SdAmy #1. Calle 7: ---. Calle 8: mp pET32a_SdAmy #2.

4.2.3- Análisis de la inducción del gen *SdAmy* en las cepas de expresión *E. coli* BL21 pLysS y *E. coli* BL21-RIL

4.2.3.1- Transformación de ambas cepas de expresión con el vector pET32a_ *SdAmy*

Con el fin de expresar la proteína *SdAmy*, se transformaron células *E. coli* BL21 pLysS y *E. coli* BL21 RIL con el plásmido pET32a_ *SdAmy*, obteniendo en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, colonias positivas de transformación resistentes a los dos antibióticos.

4.2.3.2- Inducción de la expresión de la enzima α -amilasa con IPTG

A partir de una colonia positiva (transformada con pET32a_ *SdAmy*) se inoculó un medio LB suplementado con ampicilina, que fue crecido toda la noche a 37 °C con agitación. A partir del pre-inóculo anterior se inocularon medios LB suplementados con el antibiótico ampicilina que se incubaron a 37°C durante 3 h. en agitación (hasta una D.O._{600nm}=0.4-0.6). La inducción se llevó a cabo mediante el agregado de IPTG 0,5 mM (concentración final) y los cultivos se incubaron a 18°C en agitación a 180 rpm. Luego se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos (0- 2- 4- 9 h.), se centrifugaron y las células precipitadas fueron resuspendidas y preparadas para su análisis mediante SDS-PAGE (figura 20).

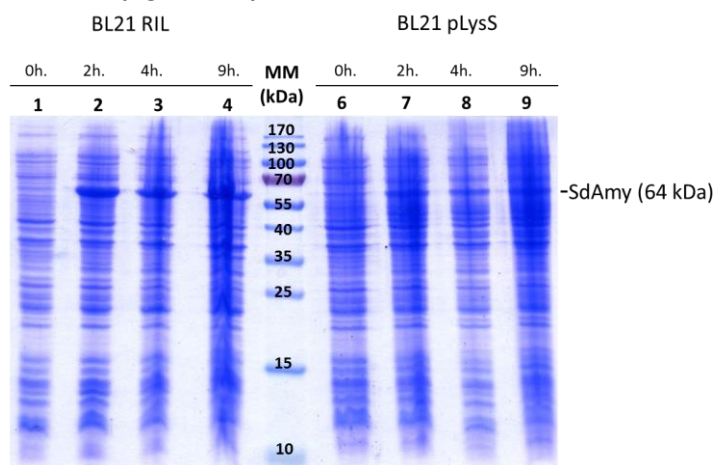


Figura 20. Análisis de inducción del gen *SdAmy* en las cepas de expresión *E. coli* BL21 RIL y BL21 pLysS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. **Calle 1:** Extracto celular *E. coli* BL21 RIL sin inducir, t=0 h. **Calle 2:** Extracto celular *E. coli* BL21 RIL t=2 h. post-inducción. **Calle 3:** Extracto celular *E. coli* BL21 RIL t=4 h. post-inducción. **Calle 4:** Extracto celular *E. coli* BL21 RIL t=9 h. post-inducción. **Calle 5:** MM, marcador de masa molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). **Calle 6:** Extracto celular *E. coli* BL21 pLysS sin inducir, t=0 h. **Calle 7:** Extracto celular *E. coli* BL21 pLysS, t=2 h. post-inducción. **Calle 8:** Extracto celular *E. coli* BL21 pLysS t=4 h. post-inducción. **Calle 9:** Extracto celular *E. coli* BL21 pLysS t=9 h. post-inducción.

A partir de los resultados obtenidos del SDS-PAGE, se observó que la cepa de *E. coli* BL21 RIL presentó una mayor eficiencia de inducción de *SdAmy* respecto a la cepa BL21 pLysS, por lo que se la seleccionó para ser utilizada como cepa de expresión en el presente trabajo.

Además en este ensayo se observó que 2 h. de inducción son suficientes para obtener una considerable expresión de *SdAmy*.

Con el fin de verificar si efectivamente las células de *E. coli* BL21 RIL contenían el gen *SdAmy*, se realizó un estudio de PCR de colonias. Para esto, se tomó una muestra de la colonia positiva de *E. coli* BL21 RIL pET32a_*SdAmy* y se la inoculó en la mezcla de reacción de PCR tal como se detalló en la Sección 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (P/V) (figura 21).

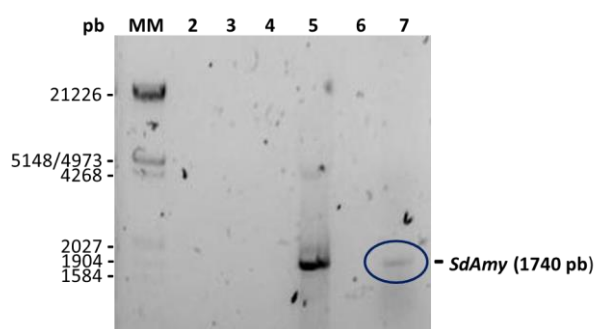


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% (P/V) de productos de PCR *SdAmy* (1740 pb). **Calle 1:** MM, marcador de tamaño molecular (λ EcoRI/HindIII-Productos Bio-Logicos). **Calle2:** ---. **Calle 3:** Blanco de PCR (sin vector/colony). **Calle 4:**---. **Calle 5:** control positivo, vector pET32a_*SdAmy*. **Calle 6:** ---. **Calle 7:** colony.

A partir de estos datos se determinó que al menos una de las colonias obtenidas en la transformación con el plásmido pET32_*SdAmy* contenía el gen de la α -amilasa de *S. degradans*.

Posteriormente, se realizó un ensayo de actividad α -amilasa en placa a partir de distintas diluciones de células de *E. coli* BL21 RIL transformadas con el vector pET32a_*SdAmy* y pET32a (control negativo). La expresión de *SdAmy* en cada cepa se indujo por 2 h., en presencia de 0,5 mM IPTG.

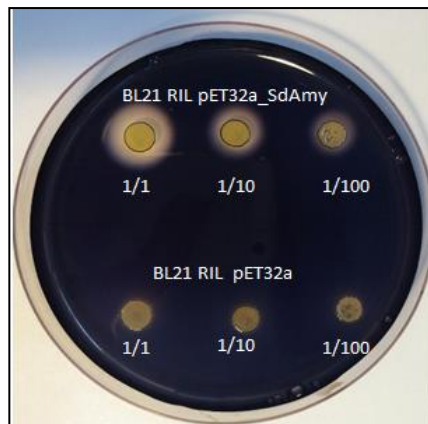


Figura 22. Ensayo de actividad en placa de diferentes concentraciones de células *E. coli* BL21 RIL conteniendo el vector pET32a_SdAmy o el vector vacío pET32a. La placa contenía 0,5% (P/V) de almidón. Las células fueron previamente inducidas por 2 h. con IPTG.

La figura 22 muestra la placa de Petri revelada con solución de lugol, luego de ser incubada durante 1 h. a 37°C. En la misma se observó la presencia de halos transparentes correspondientes a la degradación del almidón.

Los resultados indican que las células *E. coli* BL21 RIL que contienen el vector pET32a_SdAmy presentaron actividad α -amilasa, obteniéndose una mayor actividad en las muestras con una dilución menor (mayor cantidad de células), mientras que para las células BL21 RIL pET32a no se visualizó la presencia de un halo transparente. Estos resultados están de acuerdo con la expresión observada de la proteína SdAmy en las células de *E. coli* BL21 RIL.

4.2.4- Expresión y purificación de SdAmy

A partir de la colonia positiva evaluada anteriormente por *Colony* PCR, se llevó a cabo la inducción proteica mediante el agregado de IPTG 0.5 mM de concentración final y los cultivos se incubaron a 18°C durante 2 h. en agitación. Luego se tomaron muestras de 1 ml a 0 y 2 h. post-inducción, se centrifugaron y las células precipitadas fueron resuspendidas y preparadas para su análisis mediante SDS-PAGE.

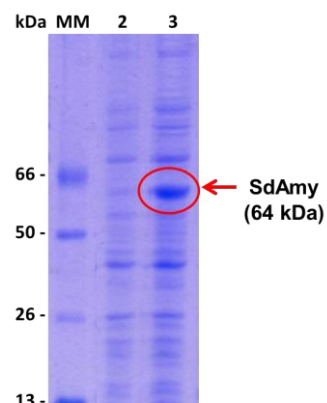


Figura 23. Análisis de la inducción de SdAmy en gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Calle 1: MM, marcador de masa molecular. Calle 2: extracto celular *E. coli* BL21 RIL sin inducir. Calle 3: extracto celular *E. coli* BL21 RIL a las 2 h. de inducción. Con rojo se indica la banda proteica correspondiente a la proteína SdAmy de aproximadamente 64 kDa.

La figura 23 muestra el análisis por SDS-PAGE de la inducción de *SdAmy* en el gel de poliacrilamida 12% (P/V) teñido con azul de Coomassie. Los resultados indican la presencia de una banda proteica de masa molecular similar a la esperada para la proteína *SdAmy* (alrededor de 64 kDa).

Posteriormente, se procedió a la purificación proteica, que se realizó mediante cromatografía de afinidad en columna comercial de sefarosa-Ni. La purificación se analizó mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida 12% (P/V).

En las figuras 24 y 25 se muestran los resultados del SDS-PAGE, en los que se observa el contenido proteico de cada una de las fracciones recuperadas durante la purificación.

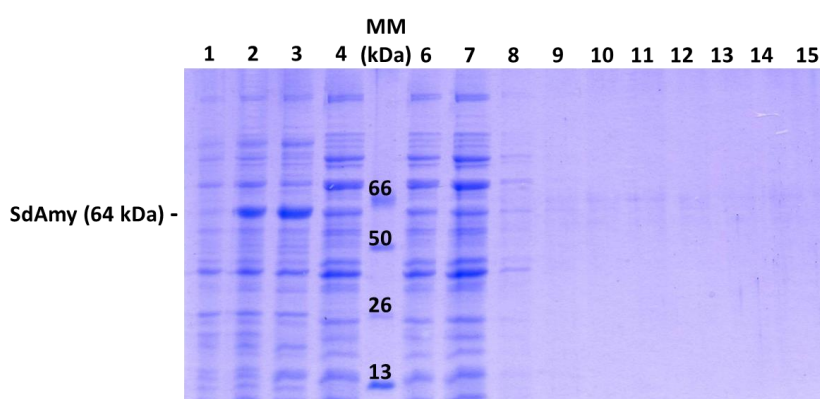


Figura 24. Análisis de las fracciones de la purificación de *SdAmy* en gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad a Níquel.

Calle 1: Extracto celular de *E. coli* BL21 RIL *SdAmy* t=0 h. sin sonicar. **Calle 2:** Extracto celular de *E. coli* BL21 RIL *SdAmy* t=2 h. de inducción, sin sonicar. **Calle 3:** Extracto celular de *E. coli* BL21 RIL *SdAmy* t=2 h. de inducción, post-sonicado. **Calle 4:** Extracto proteico del sobrenadante (SN) de *E. coli* BL21 RIL *SdAmy* t=2 h. de inducción, post-sonicado. **Calle 5:** MM, marcador de masa molecular. **Calle 6:** Fracción SN no retenida. **Calle 7:** Lavado 1. **Calle 8-15:** Diferentes fracciones obtenidas del lavado de la columna con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 0,5 mM; imidazol 20 mM.

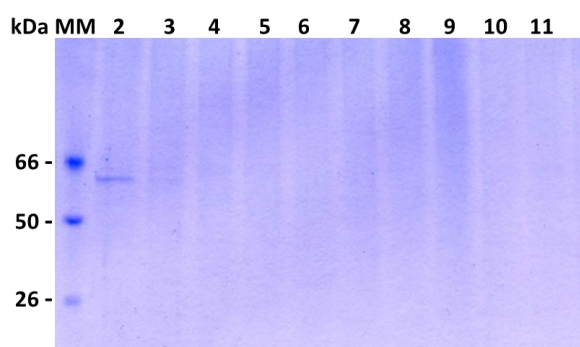


Figura 25. Análisis de las fracciones de la purificación de *SdAmy* en gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad a Níquel.

Calle 1: MM, marcador de masa molecular. **Calle 2-11:** Diferentes fracciones de elución utilizando buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM.

La figura 26-A muestra la fracción que presentó la proteína SdAmy pura; la misma fue analizada mediante ensayo de *western blot* utilizando como anticuerpo primario a-His tag comercial y un anticuerpo secundario a-IgG de conejo (fusionado a fosfatasa alcalina), figura 26-B. Los resultados indican la presencia de una banda proteica de alrededor de 64 kDa que revela con el anticuerpo a-His, sugiriendo que la proteína purificada es la SdAmy.

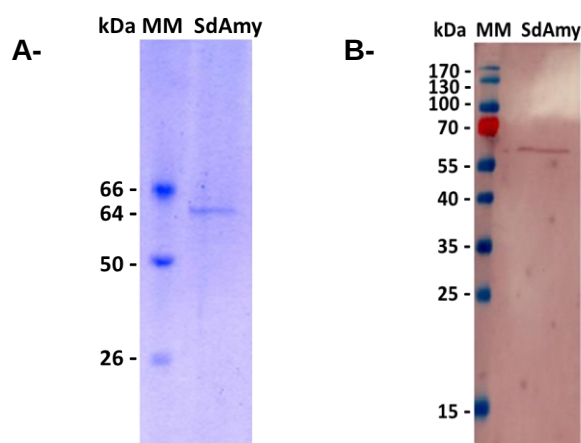


Figura 26. A- Análisis de la purificación de SdAmy en gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Calle 1, MM, marcador de masa molecular. Calle 2, fracción de SdAmy purificada. B- Ensayo de *western blot* para la identificación de la proteína SdAmy (anticuerpo primario a-His, anticuerpo secundario a-IgG de conejo). Calle 1, MM, marcador de masa molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Calle 2, fracción SdAmy purificada.

Luego de la purificación, se cuantificó la cantidad de proteína de la fracción purificada por el método de Bradford. Para esto, se realizó previamente una curva de calibración utilizando BSA como standard (concentraciones de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA), ver figura 27. A partir de estos resultados, se determinó que la concentración de SdAmy purificada fue de 0,017 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

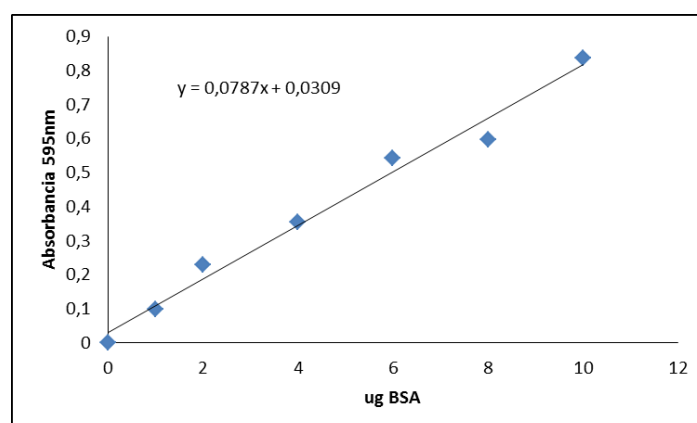


Figura 27. Curva de calibración de BSA obtenida mediante mediciones de absorbancia a 595nm.

4.2.5- Ensayos de actividad

4.2.5.1- Efecto del pH y temperatura sobre la actividad α -amilasa

Se estudió el efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática, con el fin de poder determinar el pH y la temperatura óptima a la que SdAmy presenta mayor actividad.

Perfil de pH y temperatura:

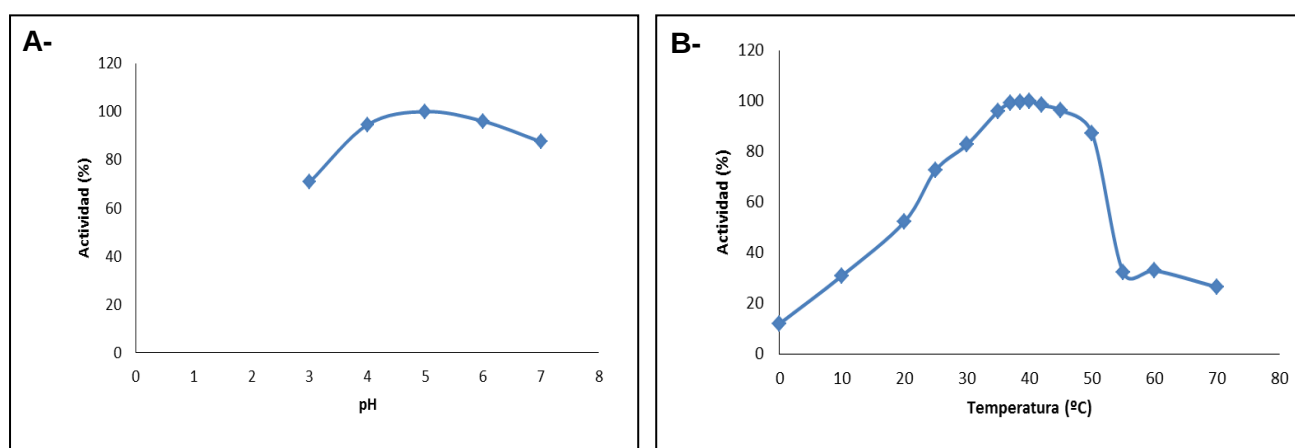


Figura 28. A- Efecto del pH sobre la actividad de SdAmy. B- Efecto de la temperatura sobre la actividad SdAmy.

Los resultados mostrados en la figura 28 sugirieron que:

- ✓ El pH óptimo al que la α -amilasa recombinante presenta mayor actividad es **pH 5**, mostrando una actividad de alrededor de 95% en el rango de **pH 4 – 6**.
- ✓ La temperatura óptima a la cual la α -amilasa recombinante presenta mayor actividad es **40°C**, sin embargo presenta elevada actividad (> 95%) en un amplio rango de temperatura entre **37- 42°C**.

A partir de estos resultados, los ensayos de actividad posteriores se llevaron a cabo a pH 5 y a 37°C.

Entre las numerosas α -amilasas caracterizadas a la fecha existen algunas pocas cuyo pH óptimo es menor a 5, como las provenientes de organismos acidófilos como *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Fusidium* sp. [38-40]. Sin embargo, la alta actividad en un amplio rango de pH

que presenta la SdAmy, con un pH óptimo cercano a 5, es similar al de muchas α -amilasas conocidas como por ejemplo las de *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis* [41].

4.2.5.2- Determinación de la actividad amilolítica de SdAmy y de una α -amilasa comercial

Con el fin de comparar la actividad amilolítica de las enzimas: α -amilasa recombinante SdAmy y α -amilasa comercial Roche, se llevaron a cabo mediciones puntuales de actividad mediante *kit* comercial (Amilokit, Wiener Lab).

Muestra	Actividad (UA/ μ g proteína)	Actividad (%)
α -amilasa Roche	$6,89 \pm 0,71$	100,0
SdAmy	$0,23 \pm 0,03$	3,3

Tabla V. Valores de actividad SdAmy y α -amilasa comercial Roche.

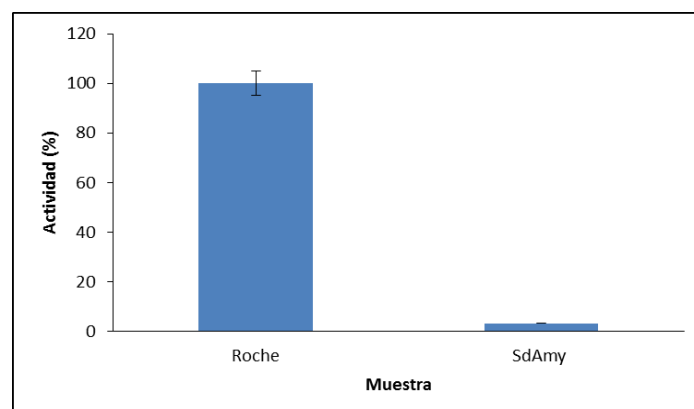


Figura 29. Actividad amilolítica (%) de la α -amilasa comercial Roche y la α -amilasa recombinante SdAmy, determinada por Amilokit.

Los resultados de actividad determinados se muestran en la figura 29 y en la tabla V. Se observó que la α -amilasa comercial presenta una actividad específica alrededor de 30 veces mayor que la SdAmy.

4.2.5.3- Determinación de actividad α -amilasa en placa

También se llevó a cabo la comparación de la actividad amilolítica de ambas α -amilasas mediante ensayos de actividad en placa.

Se añadieron distintas cantidades de las muestras proteicas a la placa conteniendo almidón y luego fueron incubadas durante 1 h. a 37°C.

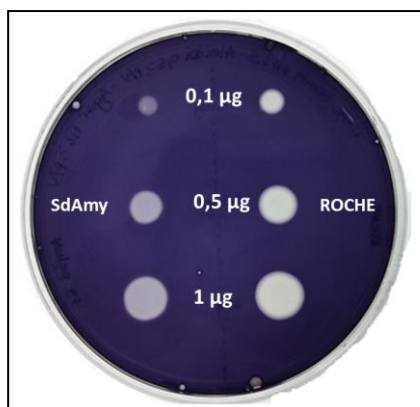


Figura 30. Ensayo de actividad en placa de muestras proteicas puras de SdAmy y de la α -amilasa comercial Roche. La placa contenía 0,5 (P/V) de almidón y fue incubada 1 h. a 37°C.

En la figura 30 se muestra la placa revelada con solución de lugol, luego de la incubación de la misma; observándose la presencia de círculos transparentes cuya transparencia está relacionada con la actividad enzimática.

Al igual que en el ensayo de determinación de actividad mediante *kit* comercial, se observó una mayor actividad (mayor transparencia) de la α -amilasa comercial Roche frente a SdAmy.

4.2.5.4- Cinética enzimática y determinación de parámetros cinéticos

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de la cinética de la enzima α -amilasa recombinante SdAmy y de la α -amilasa comercial Roche con el fin de poder determinar y comparar sus parámetros cinéticos. Se realizaron mediciones de actividad en presencia de diferentes concentraciones de almidón (g/l) (figura 31).

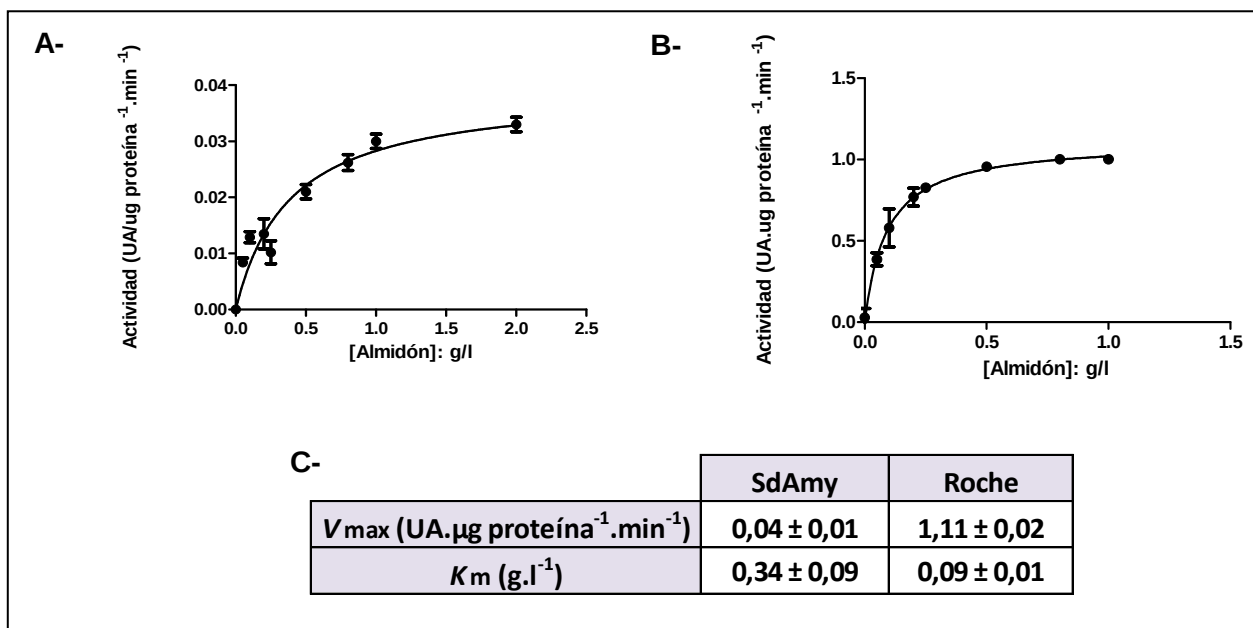


Figura 31. Gráfico de Michaelis-Menten que muestra cinética de saturación de sustrato para la reacción enzimática catalizada por SdAmy (A) y por la α -amilasa comercial Roche (B). C- Tabla de valores correspondientes a los parámetros cinéticos $V_{\max}$ y K_m para almidón de ambas α -amilasas.

Como muestra la figura 31-A y 31-B, las curvas de saturación para almidón de ambas enzimas se ajustan al modelo de Michaelis-Menten. A partir de las gráficas obtenidas, fue posible determinar los parámetros cinéticos de la reacción: velocidad máxima ($V_{\max}$) y constante de Michaelis (K_m) (figura 31-C).

Mediante la comparación de los parámetros cinéticos obtenidos se observó que la α -amilasa comercial presenta una actividad aproximadamente 28 veces mayor que la observada para SdAmy; mientras que el valor de K_m fue alrededor de 4 veces mayor para la enzima SdAmy.

Los valores de K_m encontrados para ambas enzimas están dentro del rango observado para otras α -amilasas conocidas, donde el rango de K_m para almidón se encuentra entre 0,057 – 167,6 g.l⁻¹ (www.brenda-enzymes.org).

4.2.6- Estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad α -amilasa

4.2.6.1- Inactivación térmica

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la SdAmy recombinante y la α -amilasa comercial Roche, se realizaron dos ensayos:

- 1) Las proteínas se incubaron durante 10 minutos a distintas temperaturas, y luego se llevaron a cabo mediciones de actividad enzimática a 37°C (figura 32).

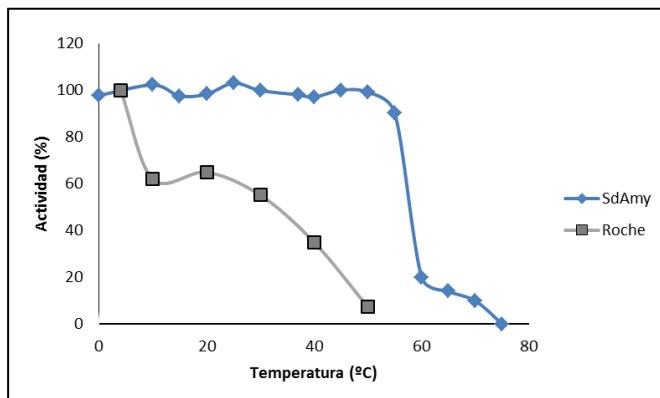


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de SdAmy y de la α -amilasa comercial Roche.

- 2) Las proteínas se incubaron a diferentes temperaturas durante un tiempo variable, y luego se realizaron mediciones de actividad enzimática a 37°C (figura 33).

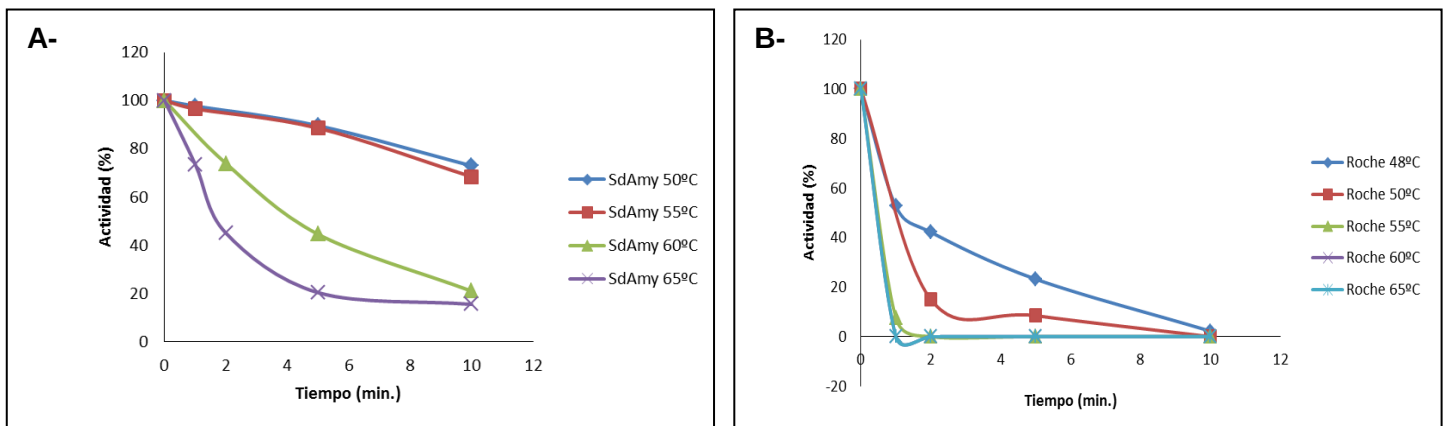


Figura 33. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad térmica de SdAmy (A) y de la α -amilasa comercial Roche (B).

En estos ensayos de estabilidad térmica se analizó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la proteína. A mayor temperatura la proteína pierde su integridad biológica, su estabilidad y por lo tanto se produce una disminución en su actividad enzimática.

Posteriormente, se llevó a cabo la comparación de estabilidad térmica de ambas enzimas a 50°C y 60°C (figura 34).

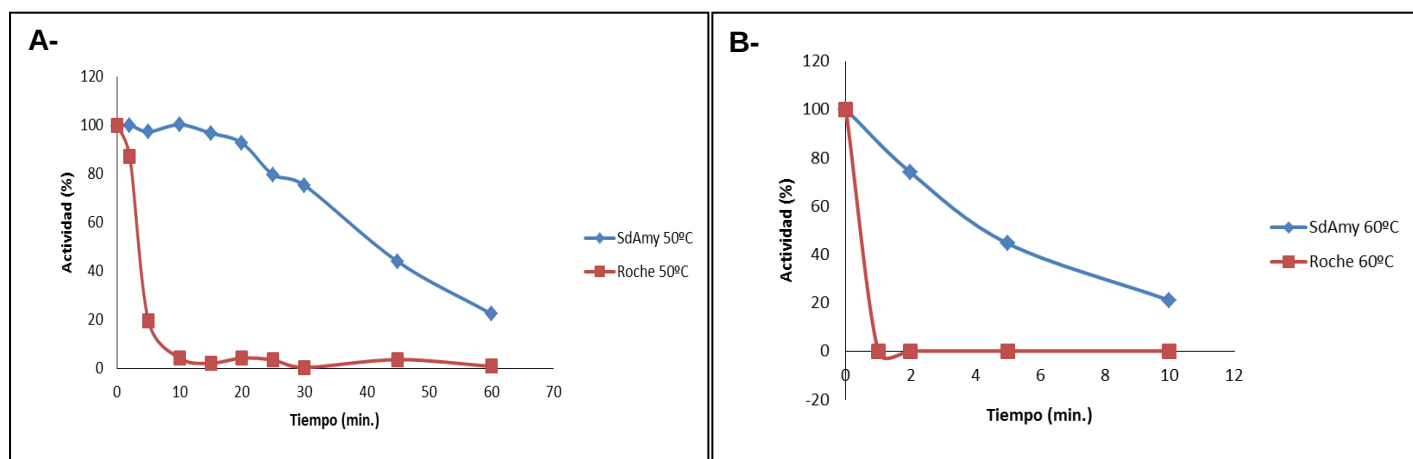


Figura 34. Estabilidad térmica de SdAmy y de la α -amilasa comercial Roche a 50 °C (A) y 60°C (B)

En la tablas VI y VII se muestran los valores de las eficiencias catalíticas para ambas enzimas al ser incubadas diferentes tiempos a 50°C y 60°C.

Tiempo (min.)	Eficiencia catalítica *	
	SdAmy 50°C	Roche 50°C
0	0,17 ± 0,02	10,18 ± 1,02
2	0,17 ± 0,02	8,89 ± 0,89
5	0,17 ± 0,02	1,96 ± 0,20
10	0,17 ± 0,02	0,42 ± 0,04
15	0,16 ± 0,02	0,00
20	0,16 ± 0,02	0,00
25	0,13 ± 0,01	0,00
30	0,13 ± 0,01	0,00
45	0,07 ± 0,01	0,00
60	0,04 ± 0,01	0,00

Tabla VI. Eficiencias catalíticas de SdAmy y α -amilasa comercial al ser incubadas 50°C a diferentes tiempos.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. g almidón⁻¹.l

Tiempo (min.)	Eficiencia catalítica *	
	SdAmy 60°C	Roche 60°C
0	0,15 ± 0,02	10,18 ± 1,02
2	0,11 ± 0,01	0,00
5	0,07 ± 0,01	0,00
10	0,03 ± 0,01	0,00

Tabla VII. Eficiencias catalíticas de SdAmy y α -amilasa comercial al ser incubadas 60°C a diferentes tiempos.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. g almidón⁻¹.l

A partir de los resultados obtenidos mostrados en las figuras 32, 33, 34 y en las tablas VI y VII, se observó que a pesar de que la α -amilasa comercial presenta una elevada actividad específica respecto a la SdAmy, ésta última es más estable térmicamente. La estabilidad térmica de SdAmy no se debe a ninguna característica específica, sino que es consecuencia de una gran variedad de factores estructurales y de composición que contribuyen a la estabilidad total de la proteína [42].

Se cree que las proteínas termófilas son menos flexibles que las proteínas mesófilas. La flexibilidad molecular es esencial tanto para la unión de sustratos como para la catálisis. Las proteínas termoestables requieren de alta temperatura para promover el movimiento y la flexibilidad necesaria para llevar a cabo la actividad catalítica, es decir, que la adaptación de la proteína a las temperaturas extremas parece ser el resultado de un equilibrio entre el aumento de la rigidez responsable de la estabilidad térmica y la flexibilidad necesaria para ejercer su función fisiológica [43].

Las relaciones entre rigidez y flexibilidad están dadas por factores intrínsecos, directamente asociados a la estructura de la molécula. Y los factores extrínsecos, que ayudan a estabilizar las proteínas en un determinado medio como solutos, ligandos, chaperonas moleculares, sales, coenzimas, activadores y el propio sustrato.

Algunos de los factores intrínsecos que caracterizan a la termoestabilidad son:

- Alto contenido de aminoácidos hidrófobos y residuos aromáticos que favorecen el "efecto hidrofóbico", es decir la agregación de las cadenas apolares de los aminoácidos en el interior de una proteína favoreciendo el aumento de la entropía de plegado de la molécula.
- Alto contenido de prolina, otorga rigidez.
- Alto contenido de cisteínas, que favorecen la formación de puentes disulfuro reduciendo la entropía del estado desplegado.
- Interacciones electrostáticas, puentes salinos, enlaces de hidrógeno, etc [43].

La buena estabilidad térmica de SdAmy es un dato de gran importancia ya que la termoestabilidad es una característica deseada de la mayoría de las enzimas industriales [14].

Cómo se mencionó en la Sección 1; las α -amilasas son enzimas de gran importancia para las industrias y, como las temperaturas de trabajo generalmente son elevadas, como por ejemplo en el proceso de obtención de bioetanol, es de interés la identificación de nuevas enzimas que puedan ser utilizadas en esas condiciones [14]. La utilización de estas enzimas termoestables permiten reducir los costos en las etapas de enfriamiento y la viscosidad, mejorar solubilidad de los sustratos, disminuir el riesgo de contaminación microbiana, etc [14] .

Por lo tanto esta característica encontrada en SdAmy hace que sea candidata interesante para aplicaciones biotecnológicas.

Determinación de la entalpía de la inactivación

La constante de velocidad de inactivación térmica (k) fue estimada a partir de las pendientes de las curvas mostradas en la figura 33.

Posteriormente se graficó $\ln(k/T)$ vs $1/T$ (figura 35), y a partir de las pendientes obtenidas y aplicando la ecuación 1, (donde T ; es la temperatura absoluta en K, R es la constante de los gases, $1,987207 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$; ΔS_i la entropía de inactivación y A la relación entre las constantes de Boltzmann y Plank), se determinó que SdAmy presenta una entalpía de inactivación (ΔH_i) de $37.892 \text{ kcal.mol}^{-1}$ y la α -amilasa comercial Roche una entalpía de inactivación (ΔH_i) de $55.944 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H_i}{RT} + \frac{\Delta S_i}{R} + \ln(A) \quad (1)$$

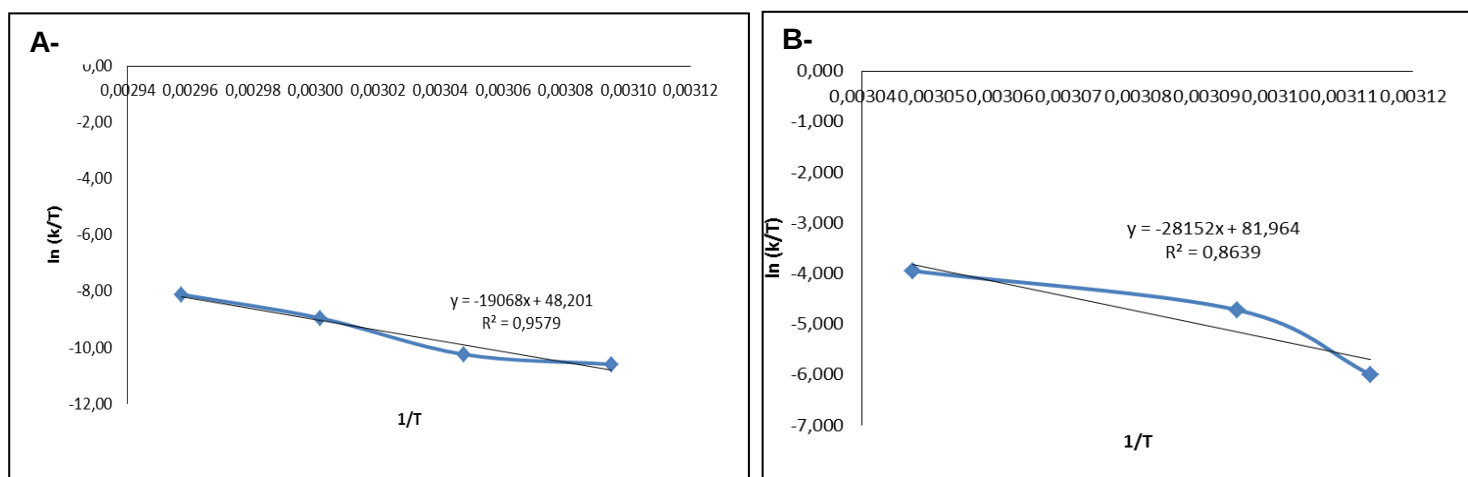


Figura 35. Estimación de la entalpía de inactivación (ΔH_i) de la enzima SdAmy (A) y de la α -amilasa comercial Roche (B).

El cambio de entalpía ΔH , es una medida de la cantidad de enlaces rotos durante el proceso de inactivación térmica [44].

Los valores positivos de ΔH_i obtenidos de ambas proteínas indican que el proceso de inactivación térmica es endotérmico, es decir en el que se consume energía.

A partir de la valores de ΔH_i obtenidos para ambas enzimas, se observó que la cantidad de energía consumida por la α -amilasa comercial es superior a la consumida por SdAmy, sugiriendo que la α -amilasa comercial sería más sensible a

la temperatura cómo se observó en los ensayos de inactivación térmica presentados anteriormente punto 4.2.6.

Inestabilidad de la α -amilasa comercial a 0°C

Durante los ensayos de estabilidad térmica, se observó que la α -amilasa comercial de Roche era inestable a 0°C. Se comparó la actividad enzimática y eficiencia catalítica de la misma incubándola 1 h. en hielo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII y en la figura 36. Estudios preliminares indicarían que esta inhibición no revierte con el tiempo, lo que podría deberse a una agregación de la proteína. Se describió para muchas proteínas que las temperaturas de 0°C o por debajo de este valor pueden inducir el mecanismo de agregación mediada por frío, incluso en ausencia de stress por congelamiento [45]. Los resultados obtenidos por Rosa et al (2017) sugieren la posibilidad de que el estrés por frío sea una alternativa útil al estrés por calor para extrapolar las predicciones de la vida útil de una proteína en condiciones de refrigeración.

Muestra	Actividad (%)	Eficiencia catalítica *
Roche	100,0	10,35 $\pm$ 1,04
Roche 1h 0°C	50,1	5,19 $\pm$ 0,52

Tabla VIII. Valores de actividad (%) y de eficiencia catalítica de la α -amilasa comercial Roche luego de la incubación a 0°C durante 1 h.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. μ g proteína⁻¹.min⁻¹.g almidón⁻¹.l

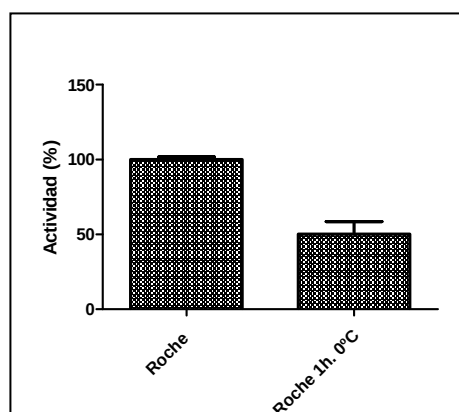


Figura 36. Actividad (%) de α -amilasa comercial Roche luego de la incubación a 0°C durante 1 h.

4.2.6.2- Estudio del efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad y estabilidad térmica de SdAmy y α -amilasa comercial Roche

La acarbosa es un oligosacárido que se obtiene de *Actinoplanes utahensis* y suele utilizarse como medicamento para tratar la diabetes tipo 2. La acarbosa es un inhibidor de α -glucosidasas como de α -amilasas [46]. Estudios preliminares indican que este inhibidor se une directamente en el sitio activo o en el sitio de unión a carbohidratos de la enzima retrasando la digestión y la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, reduciendo así el aumento de las concentraciones de glucosa en sangre [46-48].

Con el fin de evaluar el efecto de este oligosacárido sobre la estabilidad térmica de las enzimas en estudio, se incubaron las proteínas SdAmy y la amilasa de Roche a 50°C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de acarbosa (figura 37).

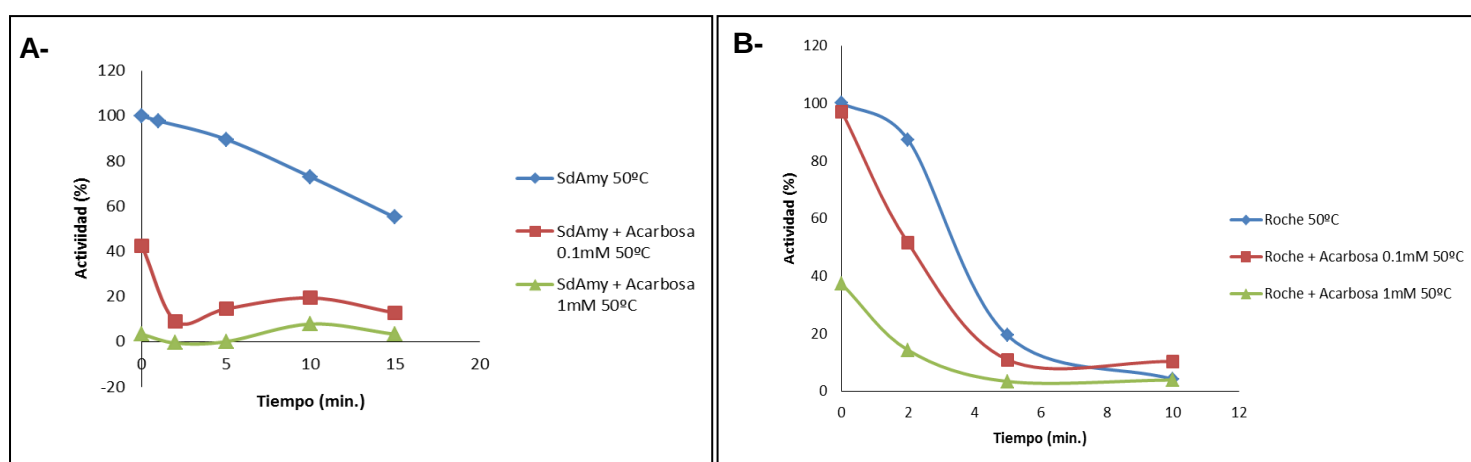


Figura 37. Efecto de la acarbosa sobre la estabilidad térmica a 50°C de la enzima α -amilasa recombinante SdAmy (A) y de la α -amilasa comercial Roche (B).

En la tablas IX y X se muestran los valores de las eficiencias catalíticas para ambas enzimas al ser incubadas diferentes tiempos a 50°C en presencia y ausencia de acarbosa.

Eficiencia catalítica SdAmy 50°C *			
Tiempo (min.)	SdAmy	SdAmy + Acarbosa 0,1mM	SdAmy + Acarbosa 1mM
0	0,17 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
5	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00
10	0,11 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,00
15	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00

Tabla IX. Valores de eficiencias catalíticas de SdAmy incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de acarbosa.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g almidón}^{-1}.\text{l}$

Eficiencia catalítica α -amilasa Roche 50°C *			
Tiempo (min.)	Roche	Roche + Acarbosa 0,1mM	Roche + Acarbosa 1mM
0	9,96 ± 1,00	9,67 ± 0,97	3,59 ± 0,34
5	1,92 ± 0,19	1,09 ± 0,11	0,32 ± 0,03
10	0,41 ± 0,04	1,03 ± 0,10	0,37 ± 0,04

Tabla X. Valores de eficiencias catalíticas de la enzima α -amilasa comercial Roche incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de acarbosa.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g almidón}^{-1}.\text{l}$

Los resultados anteriores (ver figura 37, tablas IX y X) muestran el efecto inhibitorio que causa la acarbosa sobre las α -amilasas ya que en presencia de este compuesto se observó disminución de su actividad catalítica a tiempo = 0 h., en paralelo con un descenso de la estabilidad térmica a 50°C.

Por otra parte, se decidió estudiar el efecto del ion Ca^{2+} sobre la estabilidad térmica de la enzima SdAmy y compararla con el efecto sobre la amilasa de Roche.

El calcio es un cofactor esencial para las α -amilasas ya que gran parte de estas enzimas son Ca^{2+} -dependientes [36, 49]. El rol del calcio en la activación y estabilización de las α -amilasas ha sido ampliamente estudiado. El mecanismo de estabilización propuesto implica la interacción de los cationes con residuos aminoácidos cargados negativamente, manteniendo la estructura tridimensional de la proteína [49].

Resultados preliminares muestran que los dos sitios de unión a calcio, cercanos a la región del sitio activo son elementos estructurales comunes de todas las α -amilasas [50].

Para evaluar el efecto de este catión sobre la estabilidad térmica de las enzimas en estudio, se incubaron las proteínas SdAmy y la amilasa de Roche a 50°C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de CaCl₂ (figura 38).

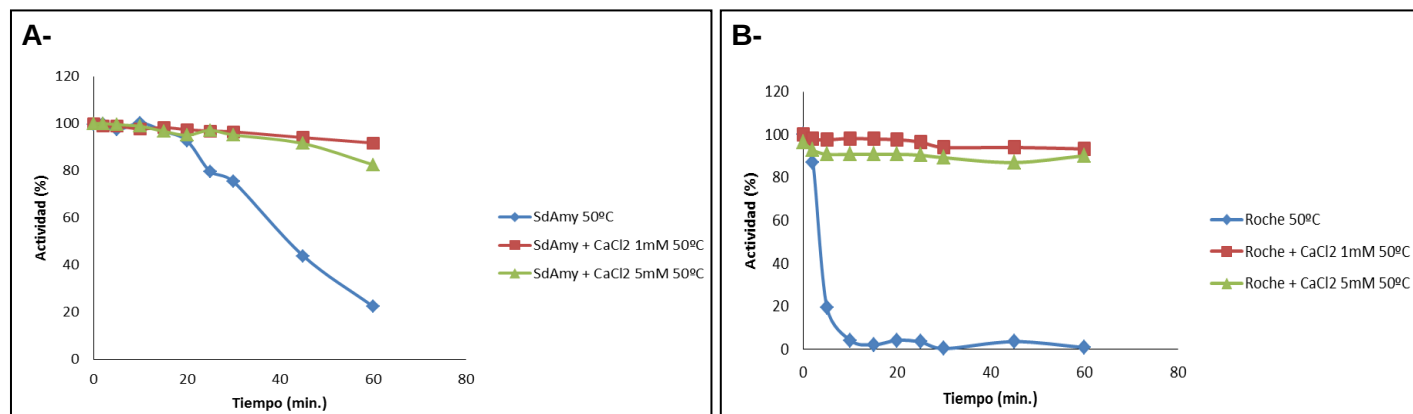


Figura 38. Efecto del calcio sobre la estabilidad térmica a 50°C de la enzima α -amilasa recombinante SdAmy (A) y de la α -amilasa comercial de Roche (B) durante 60 minutos.

En la tablas XI y XII se muestran los valores de eficiencias catalíticas para ambas enzimas al ser incubadas diferentes tiempos a 50°C en presencia y ausencia de calcio.

Eficiencia catalítica SdAmy 50°C *			
Tiempo (min.)	SdAmy	SdAmy + CaCl ₂ 1mM	SdAmy + CaCl ₂ 5mM
0	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02
5	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02
15	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02
30	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02
60	0,04 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02

Tabla XI. Valores de eficiencias catalíticas de SdAmy incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de calcio.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g almidón}^{-1} \cdot \text{l}$

Eficiencia catalítica α-amilasa Roche 50°C *			
Tiempo (min.)	Roche	Roche + CaCl ₂ 1mM	Roche + CaCl ₂ 5mM
0	10,04 ± 1,00	10,04 ± 1,00	9,69 ± 0,97
5	1,95 ± 0,20	9,79 ± 0,98	9,12 ± 0,91
15	0,00	9,83 ± 0,98	9,12 ± 0,91
30	0,00	9,44 ± 0,94	8,96 ± 0,90
60	0,00	9,37 ± 0,94	9,05 ± 0,91

Tabla XII. Valores de eficiencias catalíticas de la enzima α -amilasa comercial Roche incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de calcio.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g almidón}^{-1} \cdot \text{l}$

Los resultados mostraron que ambas α -amilasas no son Ca^{2+} -dependientes, ya que en ausencia del catión presentan actividad. Sin embargo se observó que la presencia del ión mejora significativamente la estabilidad térmica de ambas proteínas inclusive a los 60 min. de incubación a 50°C.

Estos resultados sugirieron que el calcio es un buen estabilizante de la estructura proteica, y evita la desnaturalización de la mismas por la temperatura.

Esta información es de gran importancia ya que se encontró un compuesto interesante que podría adicionarse a las mezclas enzimáticas utilizadas en los procesos industriales, para evitar la pérdida de actividad enzimática debido a las altas temperaturas de trabajo y de esta manera reducir costos.

Por último, se estudió el efecto de la maltosa sobre la estabilidad térmica de ambas enzimas.

Las α -amilasas degradan los enlaces α -1,4 glucosídicos del almidón generando como productos dextrinas, maltotriosas, maltosas y glucosas, etc [13].

El predominio de maltosa como producto final puede explicarse por la participación de distintas reacciones de hidrólisis sobre maltotriosa y maltooligosacáridos [51].

Resultados preliminares muestran la inhibición ejercida por los productos de reacción de maltosa o maltotriosa [46].

Con el fin de evaluar el efecto de la maltosa sobre la estabilidad térmica de las enzimas en estudio, se incubaron las proteínas SdAmy y la amilasa de Roche a 50°C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del disacárido (figura 39).

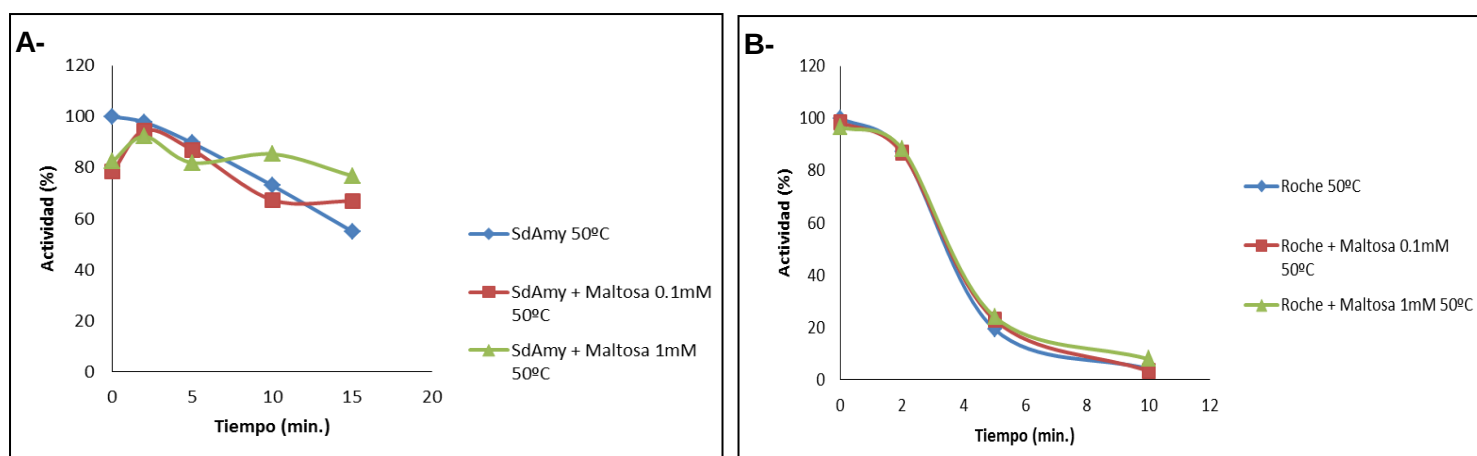


Figura 39. Efecto de la maltosa sobre la estabilidad térmica a 50°C de la enzima α -amilasa recombinante SdAmy (A) y la α -amilasa comercial Roche (B).

En la tablas XIII y XIV se muestran los valores de eficiencias catalíticas para ambas enzimas al ser incubadas diferentes tiempos a 50°C en presencia y ausencia de maltosa.

Eficiencia catalítica SdAmy 50°C *			
Tiempo (min.)	SdAmy	SdAmy + Maltosa 0,1mM	SdAmy + Maltosa 1mM
0	0,21 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02
5	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02
10	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,02
15	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02

Tabla XIII. Valores de eficiencias catalíticas de la enzima SdAmy incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de maltosa.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g almidón}^{-1}.\text{l}$

Eficiencia catalítica α -amilasa Roche 50°C *			
Tiempo (min.)	Roche	Roche + Maltosa 0,1mM	Roche + Maltosa 1mM
0	9,96 ± 1,00	9,82 ± 0,98	9,63 ± 0,96
5	1,92 ± 0,19	2,28 ± 0,23	2,40 ± 0,24
10	0,41 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,78 ± 0,08

Tabla XIV. Valores de eficiencias catalíticas de la enzima α -amilasa comercial Roche incubada a 50°C a diferentes tiempos en ausencia y presencia de maltosa.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g almidón}^{-1}.\text{l}$

Los resultados (ver figura 39; tablas XIII y XIV), sugirieron que el agregado de maltosa inhibe la reacción enzimática catalizada por la α -amilasa SdAmy por inhibición de producto. Además, se observó que mejora la estabilidad térmica de la misma a 50°C (no significativamente como en el caso del calcio) esto puede deberse a que la unión de la maltosa sobre la proteína, genere efecto protector sobre ciertos residuos aminoácidos, haciéndolos menos accesibles a que sean afectados por la temperatura, y manteniendo de esta manera la estructura de la proteína.

En cuanto al efecto de la maltosa sobre la α -amilasa comercial Roche, no se observaron cambios significativos respecto a la proteína en ausencia del disacárido.

Luego de estudiar el efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la estabilidad de las proteínas SdAmy y la α -amilasa comercial de Roche, se ensayó el efecto de los mismos sobre la actividad amilasa.

Se llevaron a cabo mediciones de actividad a 37°C de la SdAmy y la α -amilasa comercial Roche en presencia y ausencia de los distintos compuestos (figura 40).

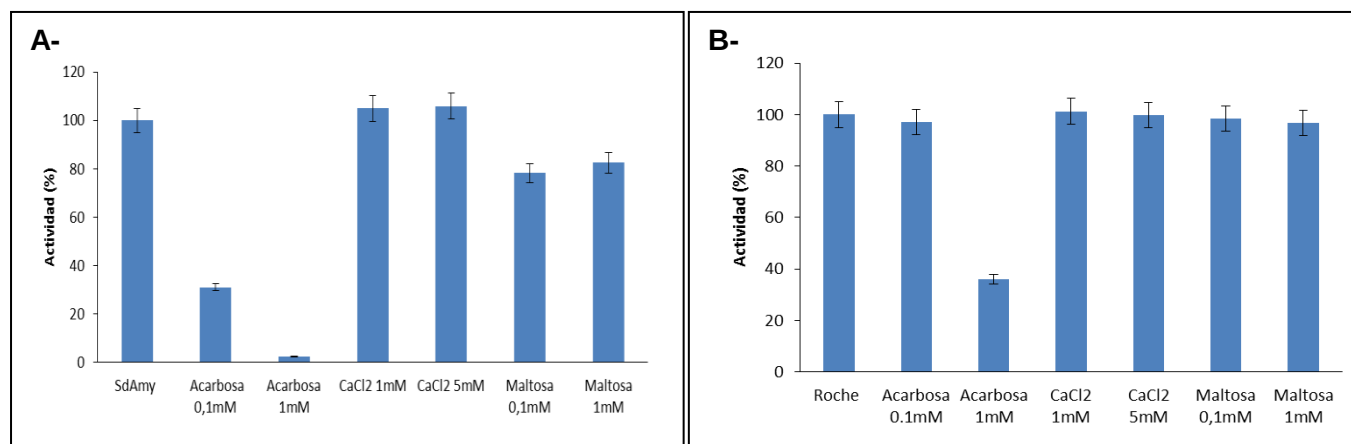


Figura 40. Efecto de la acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad amilolítica de SdAmy (A) y de la α -amilasa comercial Roche (B).

En la tabla XV se muestran los valores de eficiencias catalíticas para ambas enzimas en presencia y ausencia de los distintos compuestos.

Eficiencias catalíticas *		
Muestra	SdAmy	Roche
H ₂ O	0,21 ± 0,02	9,96 ± 1,00
Acarbosa 0.1 mM	0,06 ± 0,01	9,67 ± 0,97
Acarbosa 1 mM	0,00	3,59 ± 0,36
CaCl ₂ 1 mM	0,21 ± 0,02	10,09 ± 1,00
CaCl ₂ 5 mM	0,22 ± 0,02	9,95 ± 1,00
Maltosa 0,1 mM	0,16 ± 0,02	9,82 ± 0,98
Maltosa 1 mM	0,17 ± 0,02	9,63 ± 0,96

Tabla XV. Valores de eficiencias catalíticas de la enzima SdAmy y de la α -amilasa comercial Roche en presencia y ausencia de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa.

*Unidades de eficiencia catalítica: UA. $\mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g almidón}^{-1} \cdot \text{l}$

A partir de los resultados obtenidos mostrados anteriormente (ver figura 40 y tabla XV), se sugiere que el agregado de **acarbosa** disminuye la actividad de ambas α -amilasas (en presencia de acarbosa 0.1 mM disminuye aproximadamente un 70% la actividad de SdAmy y un 3% la de Roche. En presencia de acarbosa 1 mM disminuye un 99% la actividad de SdAmy y 65% la de Roche). El agregado de

calcio, no produce una mejora significativa en la actividad de ambas enzimas, indicando que las dos α -amilasas ensayadas no son Ca^{2+} -dependientes en cuanto a su actividad catalítica. Por último, la **maltosa** produciría una inhibición por producto más marcada en la enzima SdAmy, sin embargo la actividad de la α -amilasa comercial no pareció verse afectada por la presencia de este disacárido, al menos a las concentraciones ensayadas (hasta 1 mM maltosa).

4.2.7- Ensayo de unión de la proteína recombinante SdAmy a almidón

Cómo se mencionó en la Sección 1, SdAmy presenta un módulo de unión a carbohidratos perteneciente a la familia 20, CBM20 en el extremo C-terminal de la proteína. Los módulos de unión a carbohidratos tienen varias funciones: alinear los sustratos con los centros de reacción, alterar la superficie de los sustratos y proporcionar soporte para los agregados macromoleculares [52].

En este ensayo se analizó la capacidad de SdAmy para unir almidón mediante ensayo de unión por co-sedimentación. Se incubó la proteína SdAmy en presencia o ausencia de almidón durante 30 minutos en hielo, luego mediante centrifugación se separó sobrenadante (SN) y *pellet* (P). El almidón por ser insoluble se deposita en el fondo del tubo arrastrando la proteína unida. Las muestras fueron preparadas para su análisis mediante SDS-PAGE (figura 41).

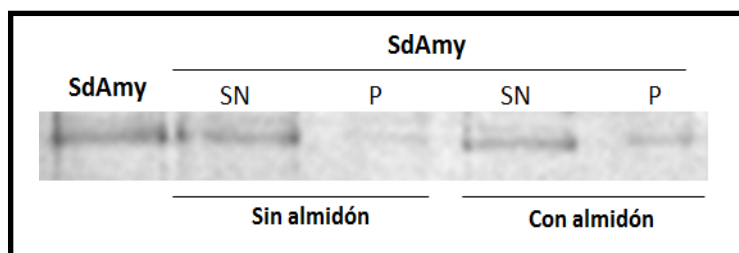


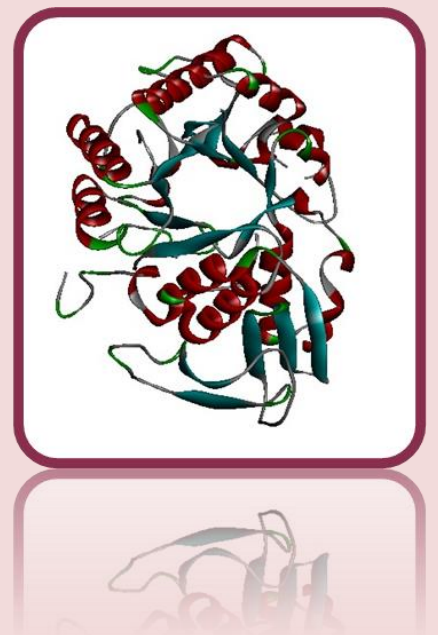
Figura 41. Gel de poliacrilamida 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Ensayo de unión de SdAmy a almidón por co-sedimentación.

Calle 1, SdAmy. **Calle 2**, SdAmy sin almidón SN. **Calle 3**, SdAmy sin almidón *Pellet*. **Calle 4**, SdAmy con almidón SN. **Calle 5**: SdAmy con almidón *Pellet*.

Con el fin de estimar el porcentaje de proteína SdAmy que se une al polisacárido se analizó la intensidad de cada banda proteica utilizando el programa bioinformático *Gel-Pro Analyzer*. Considerando que la suma de intensidades del sobrenadante (SN) y *pellet* (P) en presencia y ausencia de almidón corresponden a un 100%, se estimó que el 14.87% de SdAmy se une al polisacárido.

El ensayo de unión a almidón presentado anteriormente permitió corroborar la capacidad de SdAmy de unir almidón. Se necesitan más estudios para llevar a cabo una caracterización de la estructura, la función y el posible rol regulatorio de la región central de la proteína que contiene al dominio Amy_C y la región C-terminal que contiene un CBM20.

CONCLUSIONES



5- Conclusiones

A partir de los análisis bioinformáticos presentados en este trabajo logramos identificar una α -amilasa de la bacteria marina *Saccharophagus degradans*. Además identificamos la presencia de tres dominios presentes en la proteína, un dominio catalítico N-terminal (DC), un dominio central de función desconocida, conservado en muchas α -amilasas (Amy_C) y un dominio C-terminal que tiene alta similitud con los dominios de unión a carbohidratos de la familia 20 (CBM20), también presentes en diferentes amilasas.

Los análisis bioinformáticos realizados revelaron además la presencia de residuos aminoacídicos importantes para cada una de las regiones y sus posibles funciones, como por ejemplo, la presencia de la tríada DED, altamente conservada entre α -amilasas, correspondiente a los residuos aspartato184, glutamato210 y aspartato275 en SdAmy y posiblemente involucrados en la catálisis.

La construcción del árbol filogenético permitió identificar las 10 proteínas más cercanas evolutivamente a la proteína de estudio, todas provenientes de bacterias marinas.

Mediante la utilización de programas bioinformáticos de modelado por homología hemos obtenido diferentes modelos moleculares de la proteína completa y de sus tres dominios. El modelo obtenido de la α -amilasa de *S. degradans* exhibió pliegues similares a la α -amilasa pancreática 10SE con estructuras secundarias α -hélice y de lámina- β conservadas.

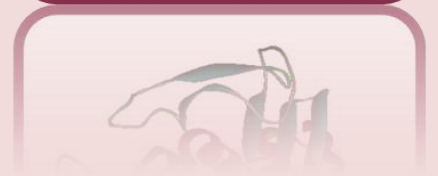
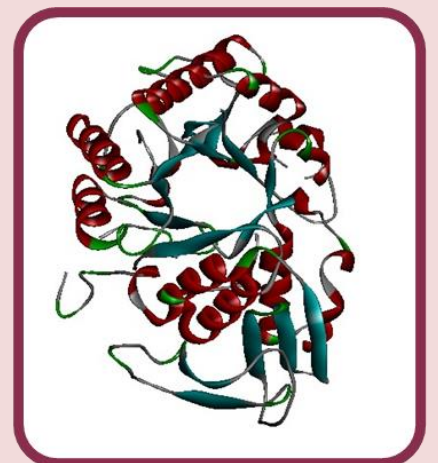
Finalmente se identificaron posibles sitios de unión a diferentes ligandos (calcio, glucosa, acarbosa, maltosa y maltotriosa). Dichos ligandos podrían unirse a regiones específicas, como por ejemplo la maltosa o glucosa al dominio Amy_C. A pesar que se desconoce la funcionalidad de este dominio, podría estar relacionado con la unión de estos ligandos (maltosa o glucosa), sugiriendo que dicho Amy_C podría tratarse de una nueva familia de CBM.

A partir de la caracterización bioquímica y cinética de la proteína α -amilasa de *S. degradans*, se determinó que presenta un pH óptimo de 5 y una temperatura óptima de 40°C. Su cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten presentando una $V_{\max}$ de $0,04 \pm 0,01$ UA.ug proteína⁻¹.min⁻¹ y una K_m de $0,34 \pm 0,09$ g.l⁻¹. Además, la proteína SdAmy presentó una mayor estabilidad térmica respecto a la α -amilasa

comercial de Roche. Esta propiedad de las proteínas es de gran interés en procesos industriales que se llevan a cabo a altas temperaturas como por ejemplo en la producción de biocombustibles como el bioetanol. Por lo tanto esta característica encontrada en SdAmy hace que sea candidata interesante para aplicaciones biotecnológicas.

A partir de los ensayos de actividad y estabilidad térmica frente a diferentes compuestos como acarbosa, calcio y maltosa, se observó que la acarbosa actúa como inhibidor de la enzima. La maltosa mostró un efecto inhibitorio, posiblemente debido a una inhibición por producto, pero incrementó la estabilidad térmica de SdAmy. Finalmente, se determinó que las actividades catalíticas de SdAmy y de la α -amilasa comercial de Roche no son Ca²⁺-dependientes, pero la presencia de este ión mejoró significativamente la estabilidad térmica de ambas proteínas reteniendo casi la totalidad de su actividad luego de ser incubadas una hora a 50°C. Esta información es de gran importancia ya que se encontró un compuesto interesante que podría adicionarse a las mezclas enzimáticas utilizadas en los procesos industriales, para evitar la pérdida de actividad enzimática debido a las altas temperaturas de trabajo y de esta manera reducir costos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6- Referencias bibliográficas

1. Stratta, J. (Agosto 2000) Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel; disponible en: http://www.bcr.com.ar/publicaciones/investigaciones/biocombustibles_stratta.pdf.
2. Pietronave, H. Biocombustibles; disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-biocombustibles_informe_de_referencia.pdf.
3. Sanchez, O. J. & Cardona, C. A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour Technol.* **99**, 5270-95.
4. Eduardo J. Trigo, A. M., Eugenio J. Cap, Alicia Zelada y Federico Villarreal (2011) Biorrefinerías: bioenergía, polímeros y compuestos químicos. Argentina Innovadora 2020. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación productiva. Disponible en: <http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/wpcontent/uploads/2013/03/Biorrefinerias2016.pdf>.
5. Smith, A. M. (2001) The biosynthesis of starch granules, *Biomacromolecules.* **2**, 335-41.
6. Tester, R. F., Karkalas, J. & Qi, X. (2004) Starch—composition, fine structure and architecture, *Journal of Cereal Science.* **39**, 151-165.
7. Ellis, J. A., Stebbing, M. & Harrap, S. B. (1998) Genetic analysis of male pattern baldness and the 5alpha-reductase genes, *The Journal of investigative dermatology.* **110**, 849-53.
8. MacNeill, G. J., Mehrpouyan, S., Minow, M. A. A., Patterson, J. A., Tetlow, I. J. & Emes, M. J. (2017) Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation, *Journal of experimental botany.* **68**, 4433-4453.
9. Alcázar-Alay, S. C. & Meireles, M. A. A. (2015) Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources, *Food Science and Technology.* **35**, 215-236.
10. Lloyd, J. R. & Kossmann, J. (2015) Transitory and storage starch metabolism: two sides of the same coin?, *Current Opinion in Biotechnology.* **32**, 143-148.
11. Smith, A. M., Denyer, K. & Martin, C. (1997) The Synthesis of the Starch Granule, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **48**, 67-87.
12. Bothast, R. J. & Schlicher, M. A. (2005) Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**, 19-25.
13. Gupta, A. & Ludascher, B. (2003) The many faces of process interaction graphs: a data management perspective, *OMICS.* **7**, 105-7.

14. Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U. & Legge, R. L. (2007) A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing, *Journal of Food Engineering*. **79**, 950-955.
15. Taylor, L. E., 2nd, Henrissat, B., Coutinho, P. M., Ekborg, N. A., Hutcheson, S. W. & Weiner, R. M. (2006) Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40T, *J Bacteriol*. **188**, 3849-61.
16. Ekborg, N. A., Gonzalez, J. M., Howard, M. B., Taylor, L. E., Hutcheson, S. W. & Weiner, R. M. (2005) *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides, *Int J Syst Evol Microbiol*. **55**, 1545-9.
17. Ko, J. K., Ko, H., Kim, K. H. & Choi, I. G. (2016) Characterization of the biochemical properties of recombinant Xyn10C from a marine bacterium, *Saccharophagus degradans* 2-40, *Bioprocess Biosyst Eng*.
18. Jung, Y. H., Kim, H. K., Song, D. S., Choi, I. G., Yang, T. H., Lee, H. J., Seung, D. & Kim, K. H. (2014) Feasibility test of utilizing *Saccharophagus degradans* 2-40(T) as the source of crude enzyme for the saccharification of lignocellulose, *Bioprocess Biosyst Eng*. **37**, 707-10.
19. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition, *Biochem J*. **382**, 769-81.
20. Shoseyov, O., Shani, Z. & Levy, I. (2006) Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications, *Microbiol Mol Biol Rev*. **70**, 283-95.
21. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press.
22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. **227**, 680-5.
23. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
24. Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem*. **112**, 195-203.
25. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Paper presented at the *Nucleic acids symposium series*.

26. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, *Computer applications in the biosciences : CABIOS*. **8**, 275-82.
27. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular biology and evolution*. **28**, 2731-9.
28. Felsenstein, J. (1985) CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP, *Evolution; international journal of organic evolution*. **39**, 783-791.
29. Pons, J.-L. & Labesse, G. (2009) @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein–ligand complexes, *Nucleic acids research*. **37**, 485-491.
30. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nature methods*. **12**, 7-8.
31. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nature protocols*. **5**, 725-38.
32. Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC bioinformatics*. **9**, 40.
33. Eisenberg, D., Luthy, R. & Bowie, J. U. (1997) VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Methods in enzymology*. **277**, 396-404.
34. Maiti, R., Van Domselaar, G. H., Zhang, H. & Wishart, D. S. (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition, *Nucleic acids research*. **32**, 590-594.
35. Møller, M. S. & Svensson, B. (2016) Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation, *Current Opinion in Structural Biology*. **40**, 33-42.
36. Liebl, W., Stemplinger, I. & Ruile, P. (1997) Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium, *J Bacteriol*. **179**, 941-8.
37. Kim, M. J., Lee, S. B., Lee, H. S., Lee, S. Y., Baek, J. S., Kim, D., Moon, T. W., Robyt, J. F. & Park, K. H. (1999) Comparative study of the inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose, *Arch Biochem Biophys*. **371**, 277-83.
38. Choi, K. H. & Cha, J. (2015) Membrane-bound amylopullulanase is essential for starch metabolism of *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639, *Extremophiles : life under extreme conditions*. **19**, 909-20.

39. Kanno, M. (1986) A *Bacillus acidocaldarius* α -Amylase That is Highly Stable to Heat under Acidic Conditions, *Agricultural and Biological Chemistry*. **50**, 23-31.
40. Ohno, N., Ijuin, T., Song, S., Uchiyama, S., Shinoyama, H., Ando, A. & Fujii, T. (1992) Purification and Properties of Amylases Extracellularly Produced by an Imperfect Fungus, *Fusidium* sp. BX-1 in a Glycerol Medium, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **56**, 465-71.
41. van der Kaaij, R. M., Janecek, S., van der Maarel, M. J. & Dijkhuizen, L. (2007) Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal alpha-amylase enzymes, *Microbiology (Reading, England)*. **153**, 4003-15.
42. Lasa, I. & Berenguer, J. (1993) Thermophilic enzymes and their biotechnological potential, *Microbiologia (Madrid, Spain)*. **9**, 77-89.
43. Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N. & Silva, R. d. (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial, *Química Nova*. **30**, 136-145.
44. Z. Deylami, M., Abdul Rahman, R., Tan, C., Bakar, J. & Olusegun, L. (2014) *Thermodynamics and kinetics of thermal inactivation of peroxidase from mangosteen (Garcinia mangostana L.) pericarp*.
45. Rosa, M., Roberts, C. J. & Rodrigues, M. A. (2017) Connecting high-temperature and low-temperature protein stability and aggregation, *PLoS One*. **12**.
46. Al Kazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Prodanov, E. & Santimone, M. (1998) The mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose, *European journal of biochemistry*. **252**, 100-7.
47. Bischoff, H. (1995) The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes, *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. **18**, 303-11.
48. Gu, S., Shi, J., Tang, Z., Sawhney, M., Hu, H., Shi, L., Fonseca, V. & Dong, H. (2015) Comparison of glucose lowering effect of metformin and acarbose in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis, *PLoS One*. **10**.
49. Morris, C., L. Fichtel, S. & J. Taylor, A. (2011) *Impact of Calcium on Salivary α -Amylase Activity, Starch Paste Apparent Viscosity, and Thickness Perception*. Vol. 4. p. 116-122
50. Buisson, G., Duee, E., Haser, R. & Payan, F. (1987) Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity, *The EMBO journal*. **6**, 3909-16.
51. Collins, B. S., Kelly, C. T., Fogarty, W. M. & Doyle, E. M. (1993) The high maltose-producing alpha-amylase of the thermophilic actinomyces, *Thermomonospora curvata*, *Appl Microbiol Biotechnol*. **39**, 31-5.

52. Barchiesi, J., Hedin, N., Gomez-Casati, D. F., Ballicora, M. A. & Busi, M. V. (2015) Functional demonstrations of starch binding domains present in *Ostreococcus tauri* starch synthases isoforms, *BMC research notes*. **8**, 613.

Fe de Errata

- En la sección 2, página 11, el objetivo específico 1 se modifica a: “Realizar análisis bioinformático de los dominios conservados, análisis filogenético y llevar a cabo el modelado molecular de la proteína α -amilasa de *S. degradans*.”
- En la página 16, en las electroforesis en geles de agarosa se utilizó SYBR Safe 1X (Invitrogen, código de catálogo S33102, siguiendo las indicaciones del fabricante).
- En la página 17 y 47 (figura 24) la concentración de NaCl en *buffer* de unión fue 0,5 M.
- Las cepas BL21 presentadas a lo largo del trabajo corresponden a BL21 DE3.
- En la página 20, C y D de la ecuación 1, corresponden a la absorbancia a 640nm del control (C) sin proteína, y de la muestra desconocida (D) con proteína.
- En la página 43, figura 19-A, la electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para evaluar la integridad del vector pET32a_SdAmy. Y el ensayo de PCR (figura 19-B), para evaluar la presencia del inserto *SdAmy* en el plásmido obtenido.
- Las concentraciones iniciales de las proteínas utilizadas durante los ensayos son las siguientes:
 - α -amilasa comercial Roche: Stock 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
 - α -amilasa *SdAmy*: 0,017 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- La cantidad de proteína utilizada para las determinaciones de actividad mediante *kit* comercial fueron las siguientes:
 - Roche: 0,01 μg
 - *SdAmy*: 0,21 μg
- Las actividades obtenidas mediante *kit* comercial se expresan en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl). UA, es la cantidad de enzima contenida en 100ml de muestra, que puede hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos, en las condiciones de reacción.
- A lo largo del texto la eficiencia catalítica corresponde a “eficiencia enzimática” expresada en UA. $\mu\text{g proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g almidón}^{-1}.\text{l}^{-1}$.

ANEXO I

A partir de las tablas en las que se compara la eficiencia enzimática de la proteína SdAmy con la α -amilasa de Roche (página 54), se muestra la comparación de la actividad (%) de SdAmy respecto a la α -amilasa de Roche al ser incubadas a 50 y a 60°C; tomando como valor de 100% la actividad de la α -amilasa de Roche.

Tiempo (min.)	Actividad (%)	
	SdAmy 50°C	Roche 50°C
0	3,6	100,0
2	3,6	90,0
5	3,6	20,0
10	3,6	4,0
15	3,4	0
20	3,4	0
25	3,4	0
30	3,1	0
45	1,8	0
60	0,9	0

Tabla VI. Actividad amilolítica (%) de SdAmy y α -amilasa comercial al ser incubadas 50°C a diferentes tiempos.

Tiempo (min.)	Actividad (%)	
	SdAmy 60°C	Roche 60°C
0	3,6	100,0
2	2,7	0
5	2,1	0
10	0,9	0

Tabla VI. Actividad amilolítica (%) de SdAmy y α -amilasa comercial al ser incubadas 60°C a diferentes tiempos.